

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 373**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 9/04	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2012 PCT/US2012/049018**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13019805**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2012 E 12820719 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2739645**

54 Título: **Anticuerpo específico de endoglina para uso en un método de tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de afecciones relacionadas**

30 Prioridad:

01.08.2011 US 201161513930 P
21.12.2011 US 201161578477 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

TUFTS MEDICAL CENTER, INC. (100.0%)
750 Washington Street
Boston, MA 02111, US

72 Inventor/es:

KAPUR, NAVIN K. y
KARAS, RICHARD H.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 714 373 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo específico de endoglina para uso en un método de tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de afecciones relacionadas

Declaración según Investigación financiada con fondos federales

5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno de los Estados Unidos bajo la subvención número HL094909 adjudicada por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene determinados derechos de esta invención.

Antecedentes de la invención

10 La invención se refiere al tratamiento de la insuficiencia cardíaca, disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, fibrosis ventricular derecha debido a hipertensión pulmonar, cardiomiopatía, o un post-infarto de miocardio o reducción de la fibrosis, particularmente la fibrosis cardíaca.

15 La insuficiencia cardíaca es la causa principal de morbilidad y de mortalidad que afecta a más de 24 millones de personas en todo el mundo (Rosamond et al., Circulation 117:e25-146, 2008, Cowie et al., Eur. Heart. J. 18:208-25, 1997, Davies et al., Lancet 358:439-44, 2001). Independientemente del mecanismo perjudicial, un descenso en la función del ventrículo izquierdo (LV, de sus siglas en inglés) conduce a un volumen LV reducido y a una sobrecarga de presión. Este estímulo hemodinámico activa varias cascadas de señalización, que alteran la estructura y la función cardíaca, un proceso conocido como remodelación cardíaca. La sobrecarga hemodinámica persistente conduce a una hipertrofia del cardiomiocito y a fibrosis intersticial, seguido de necrosis del miocito y al empeoramiento del reemplazo de la fibrosis. En cada fase del remodelado cardíaco la remodelación desde la carga aguda hasta la hipertrofia compensatoria, están implicadas varias cascadas de señalización (Berk et al., J. Clin. Invest. 117:568-75, 2007). El efecto inhibitorio de la atorvastatina sobre la expresión de Endoglina en fibroblastos cardíacos cultivados se describe en Kou-Gi et al., European Journal of Heart Failure 12:219-226, 2010. El efecto de la atorvastatina sobre la hipertensión pulmonar se estudió en Jiang et al. Circulation 118:S945, 2008. Porciones de unión al ligando, truncadas específicas de Endoglina se describen en la Patente WO 2012/145539. Estos polipéptidos se emplean para inhibir la angiogénesis, particularmente en pacientes que padecen de trastornos relacionados con la angiogénesis. Polipéptidos de Endoglina soluble y ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos se describen en la Patente WO 2011/088047.

Compendio de la invención

30 Como se describe en detalle a continuación, los inventores han descubierto que las señales mediadas por TGFβ1 a través del receptor de Endoglina promueve el daño del tejido cardíaco, particularmente la fibrosis cardíaca, que se observa en individuos que padecen de insuficiencia cardíaca. De manera importante, los inventores han descubierto que la forma soluble de Endoglina (sEng) es protectora frente a estos efectos, presumiblemente por su capacidad para unirse a TGFβ1 y, por tanto, al descenso de la señalización a través de la forma del receptor unido a la membrana de Endoglina (mEng). Además, los investigadores han descubierto que reduciendo la expresión o la actividad de mEng también se limita la señalización de TGFβ1 en el corazón, dando como resultado una fibrosis limitada y una supervivencia mejorada.

40 Por consiguiente, la invención caracteriza una composición que comprende un anticuerpo específico de Endoglina, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endoglina o que es un antagonista del receptor de Endoglina, para usar en un método para tratar o tratar profilácticamente la insuficiencia cardíaca, disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, fibrosis ventricular derecha debido a hipertensión pulmonar, cardiomiopatía, o post infarto de miocardio en un sujeto que necesita del mismo, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo específico de Endoglina, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endoglina o que es un antagonista del receptor de Endoglina, en donde dicho sujeto padece o ha padecido de una enfermedad arterial coronaria.

45 Por otra parte, la invención caracteriza una composición que comprende un anticuerpo específico de Endoglina, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endoglina o que es un antagonista del receptor de Endoglina, para usar en un método para reducir la fibrosis en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto un cantidad eficaz de un anticuerpo específico de Endoglina, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endoglina o que es un antagonista del receptor de Endoglina.

50 Se describe un método para tratar o tratar profilácticamente la insuficiencia cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca sistólica, o insuficiencia cardíaca diastólica), disfunción del ventrículo izquierdo (por ejemplo, disfunción ventricular izquierda asintomática o disfunción ventricular izquierda seguido de infarto de miocardio), disfunción del ventrículo derecho, hipertensión (por ejemplo, adulta o pediátrica), infarto agudo de miocardio, o post infarto de miocardio en un sujeto que lo necesita. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que inhibe la actividad de Endoglina y, limita de ese modo, la señalización de TGFβ1. Dicha composición puede incluir un polipéptido soluble, donde el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos de Endoglina soluble, por ejemplo, de 26 a 586 aminoácidos de SEQ ID NO:1 o

- SEQ ID NO:2, o un fragmento inhibitorio de TGFβ1 o análogo del mismo. El análogo de Endogлина soluble puede tener una secuencia de aminoácidos idénticos sustancialmente (por ejemplo, al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) a los aminoácidos 26 a 586 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. Dicha composición puede incluir un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en la presente memoria, tal como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab'2, scFv, SMIP, diabody, nanocuerpo, aptámero, o dominio de anticuerpo). El anticuerpo puede ser un antagonista de cualquier componente del receptor de Endogлина, por ejemplo, que se une a mEng. La composición puede incluir una molécula ARNsi (ARN pequeño de interferencia) que es capaz de reducir la expresión de mEng. La administración de la composición puede dar como resultado una reducción de la fibrosis cardíaca.
- 5
- 10 Según la invención, el sujeto puede padecer o puede haber padecido una enfermedad arterial coronaria, una enfermedad cardíaca congénita, un ataque cardíaco, una enfermedad de la válvula cardíaca, o una arritmia. En realizaciones particulares, la administración es intravenosa, oral, intramuscular, intra-arterial, subcutánea, intraperitoneal, o intralesional.
- 15 Se describe un kit que incluye (a) una composición que inhibe la actividad de Endogлина (por ejemplo, cualquier composición descrita en la presente memoria, tal como Endogлина soluble, o un fragmento o análogo de la misma); y (b) instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, hipertensión, infarto agudo de miocardio, infarto post miocardio o cualquier otra afección o enfermedad descrita en la presente memoria.
- 20 Se describe un método para reducir la fibrosis (por ejemplo, fibrosis cardíaca) en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto (por ejemplo, intravenosamente, oralmente, intramuscularmente, intra-arterialmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, o intralesionalmente) una cantidad eficaz de una composición que inhibe la señalización de Endogлина mediada por TGFβ1. Dicha composición puede incluir un polipéptido soluble, donde el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos de Endogлина soluble o un fragmento inhibidor de TGFβ1 o un análogo del mismo, por ejemplo, cuando la Endogлина soluble incluye de 26 a 586 aminoácidos de SEQ ID NO:1 o
- 25 SEQ ID NO:2 o cuando el análogo de Endogлина soluble tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de Endogлина soluble humana que aparece de manera natural. Dicha composición puede incluir un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, cuando el anticuerpo es un antagonista del receptor de Endogлина, tal como un anticuerpo que se une al receptor de Endogлина). Dicha composición puede incluir una molécula ARNsi que es capaz de reducir la expresión de Endogлина. El sujeto puede padecer de una afección seleccionada del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, sistólica, o diastólica), disfunción del ventrículo izquierdo (por ejemplo, disfunción ventricular izquierda asintomática o disfunción ventricular izquierda seguida de infarto de miocardio), disfunción del ventrículo derecho, hipertensión (por ejemplo, hipertensión del adulto o hipertensión pediátrica), infarto agudo de miocardio, o post infarto de miocardio. El sujeto puede padecer o puede haber padecido de una enfermedad arterial coronaria, una
- 30 enfermedad cardíaca congénita, un ataque cardíaco, una enfermedad de la válvula cardíaca, o una arritmia.
- 35 Por "sujeto" se entiende a un ser humano o un animal (por ejemplo, mamífero).
- Por "tratar" una enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto se entiende reducir al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno, o afección mediante la administración al sujeto de un agente terapéutico.
- 40 Por "tratar profilácticamente" una enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto se entiende reducir la frecuencia de aparición o reducir la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección mediante la administración a un sujeto de un agente terapéutico antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad.
- 45 Por "Endogлина soluble" se entiende un polipéptido que incluye el dominio extracelular de Endogлина, pero no incluye los dominios transmembrana o citoplásmico de Endogлина y que tienen la capacidad de reducir la activación del receptor de Endogлина mediada por TGFβ1. La Endogлина soluble puede incluir de 26 a 586 aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 mostradas en la Figura 10.
- Por "fragmento de Endogлина soluble" se entiende un fragmento de al menos 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, ó 450 aminoácidos de Endogлина soluble.
- Por "Endogлина de unión a la membrana (mEng)" se entiende la Endogлина de longitud completa que incluye los dominios extracelular, trans-membrana, y citoplásmico (de 1-633 aminoácidos). En la definición de mEng están incluidas tanto la isoforma larga (L) como la isoforma corta (S) de Endogлина.
- 50
- Por "identidad sustancial" o "idéntico sustancialmente" se entiende una secuencia de polipéptido o polinucleótido que tiene la misma secuencia de polipéptido o de polinucleótido, respectivamente, que una secuencia de referencia, o que tiene un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, que son el mismo en la correspondiente localización dentro de una secuencia de referencia cuando las dos secuencias se alinean de manera óptima. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que es "idéntica sustancialmente" a una secuencia de referencia tiene al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de
- 55
- identidad a la secuencia de aminoácidos de referencia. Para polipéptidos, la longitud de secuencias de comparación serán generalmente al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200,

250, 300, ó 350 aminoácidos contiguos (por ejemplo, una secuencia de longitud completa). Para ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25 nucleótidos contiguos (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de longitud completa). La identidad de la secuencia se puede medir empleando un programa informático de análisis de secuencias en una configuración predeterminada (por ejemplo, el paquete informático de Análisis de Secuencias del Grupo Genetics Computer, de la Universidad del Centro de Biotecnología de Wisconsin, Avenida de la Universidad 1710, Madison, WI 53705). Tal programa informático puede emparejar secuencias similares mediante la asignación de grados de homología a varias sustituciones, deleciones, y otras modificaciones.

A partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones, serán evidentes otras características y ventajas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1H son gráficas e imágenes que muestran que la expresión reducida de Endogлина se correlaciona con una función cardíaca y una supervivencia mejoradas en la insuficiencia cardíaca inducida por una sobrecarga de presión. La Figura 1A es un Western blot representativo de la expresión de Endogлина en el endotelio, cardiomiocitos, y fibroblastos cardíacos de ratón. La Figura 1B es un Western blot que muestra la expresión reducida de Endogлина en lisados del ventrículo izquierdo a partir de ratones Eng^{+/-} en comparación con ratones de tipo salvaje (WT, de sus siglas en inglés) (n=3/grupo). Las Figuras 1C y 1D son gráficas que muestran que el ARNm y la expresión de proteína de Endogлина ventricular se incrementan en ratones WT después de la constricción de la aorta torácica (TAC, de sus siglas en inglés). Los ratones Eng^{+/-} muestran un ARNm de Endogлина y niveles de proteínas reducidos en comparación con los ratones WT (n=6/grupo). La Figura 1E es una gráfica que muestra que los niveles circulantes de Endogлина soluble se aumentan después de dos semanas, y después se reducen al valor normal en ratones WT después de la TAC. Los niveles de sEng son significativamente más bajos en ratones Eng^{+/-} en comparación con los ratones WT a lo largo de todos los puntos de tiempo de TAC (n=6/grupo). La Figura 1F es un ecocardiograma en modo-M que muestra la progresiva dilatación del LV en ratones WT en comparación con los ratones Eng^{+/-} con función LV preservada después de la TAC. La Figura 1G es una gráfica que muestra bucles de volumen-presión ventricular izquierda representativa después de cuatro semanas de TAC, la cual muestra menos sobrecarga de volumen y mayor presión sistólica LV en ratones Eng^{+/-} en comparación con los ratones WT después de la TAC. La Figura 1H es una gráfica que muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra una supervivencia marcadamente mejorada en ratones Eng^{+/-} en comparación con ratones WT después de diez semanas de TAC (n=8/grupo). (*, p<0,05, frente a Simulación en WT; +, p<0,05 frente a Eng^{+/-} Simulación; ‡, p<0,05 frente a ratones WT en el correspondiente punto de tiempo).

La Figura 2 es una gráfica que muestra que la expresión de ARNm de Endogлина aumenta en el LV, pero no en la aorta distal, de ratones WT que se han sometido a TAC.

Las Figuras 3A-3H son imágenes y gráficas que muestran que la expresión reducida de Endogлина no afecta a la hipertrofia cardíaca, pero se asocia con un aumento de la capilaridad del miocardio. La Figura 3A es una microfotografía que muestra la tinción histológica representativa y la Figura 3B es un diagrama de barras del área transversal del cardiomiocito ventricular izquierdo que muestra hipertrofia tanto en ratones WT como Eng^{+/-} después de cuatro semanas de TAC. Las Figuras 3C y 3D son gráficas que muestran la expresión del LV de genes fetales asociados con hipertrofia cardíaca (β -MHC y SERCa) que muestran patrones similares en ratones WT y Eng^{+/-} después de cuatro semanas de TAC. La Figura 3E es una gráfica que muestra la expresión proteica LV de calcineurina en ratones WT y Eng^{+/-} después de cuatro semanas de TAC. La Figura 3F es una microfotografía que muestra la tinción histológica representativa de los capilares del miocardio de LV empleando un anticuerpo anti-CD31 que demuestra el aumento de la densidad capilar en ratones Eng^{+/-}, en comparación con los ratones WT, después de cuatro semanas de TAC. Las Figuras 3G y 3H son diagramas de barras que muestran la cuantificación de los capilares del miocardio en el LV después de cuatro semanas de TAC en ratones WT y Eng^{+/-}.

Las Figuras 4A-4B son gráficas que muestran cambios similares en β -MHC y SERCa en ratones WT y Eng^{+/-} después de diez semanas de TAC.

Las Figuras 5A-5F son imágenes y gráficas que muestran una fibrosis cardíaca reducida en ratones Eng^{+/-} después de una insuficiencia cardíaca inducida por una sobrecarga de presión. La Figura 5A es una microfotografía de tinción histológica representativa de la abundancia de colágeno del ventrículo izquierdo en ratones WT y Eng^{+/-} después de TAC. La Figura 5B es una gráfica que muestra la cuantificación del porcentaje de fibrosis del LV que muestra una fibrosis significativamente menor en los ratones Eng^{+/-} en comparación con los ratones WT después de TAC (n=6/grupo). La Figura 5C es una gráfica que muestra que los niveles de ARNm de Colágeno Tipo I del LV se reducen en los ratones Eng^{+/-} después de cuatro semanas de TAC, en comparación con los ratones WT (n=6/grupo). La Figura 5D es una gráfica que muestra que la expresión de la proteína de Colágeno Tipo I en LV aumenta de una manera dependiente del tiempo en ratones WT después de TAC. Se observaron niveles significativamente menores en ratones Eng^{+/-} en cada punto de tiempo (n=6/grupo). La Figura 5E es una gráfica que muestra niveles aumentados de ARNm TGF β 1 tanto en ratones WT como Eng^{+/-} después de cuatro semanas de TAC. La Figura 5F es una gráfica y una imagen de Western blot que muestra la expresión aumentada de pSmad-2/3 en ratones WT después de TAC. No hay cambio en la expresión de pSmad-2/3 en ratones Eng^{+/-} después de TAC.

Las Figuras 6A-6D son gráficas. La Figura 6A muestra la expresión de ARNm de colágeno Tipo I después de diez semanas de TAC en ratones WT y Eng^{+/-}. La Figura 6B es una gráfica que muestra los niveles de expresión de la proteína TGFβ1 activa en lisados del tejido LV cuatro semanas después de TAC. La Figura 6C muestra que la expresión de ARNm de la actividad de TGFβ1 de la diana descendente, PAI-1, se atenúa significativamente en ratones Eng^{+/-} sometidos a TAC en comparación con los controles WT. La Figura 6D muestra que la expresión proteica de pSmad-1/5/8 está inalterado en ratones WT, pero aumenta en ratones Eng^{+/-} después de cuatro semanas (cuantificación en la gráfica de barras para n=6 ratones/grupo debajo del Western blot representativo).

Las Figuras 7A-7F son gráficas e imágenes que muestran los papeles opuestos de mEng y sEng como moduladores de la síntesis de colágeno Tipo I inducido por TGFβ1 en fibroblastos cardíacos humanos (hCF). La Figura 7A muestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-Endogлина reduce el ARNm de colágeno Tipo I (gráfica de barras) y la expresión de proteína (Western blot) en hCF. La Figura 7B muestra que el silenciamiento de la expresión de Endogлина atenúa el ARNm de colágeno de Tipo I inducido por TGFβ1 (gráfica de barras) y la expresión proteica (western blot) en hCF. La Figura 7C es una imagen de un Western blot que muestra la sobre-expresión de Endogлина de longitud completa mediada por adenovirus (Ad-FL-Eng) atenúa la síntesis proteica de colágeno de Tipo I inducido por TGFβ1 en hCF. La Figura 7D muestra los niveles de Endogлина soluble en un medio condicionado a partir de hCF transfectados con Ad-FL-Eng. La Figura 7E muestra que la Endogлина soluble humana recombinante (RhsEng) atenúa la expresión proteica de colágeno Tipo I inducido por TGFβ1 de una manera dependiente de la dosis (cuantificación de Western blot mostrado en la gráfica de barras). La Figura 7F muestra que el medio condicionado a partir de células COS-7 transfectadas con un adenovirus que sobre-expresa sEng humano (AdhsEng) atenúa la síntesis proteica de colágeno Tipo I inducido por TGFβ1 (gráfica de barras y Western blot) y la expresión de pSmad-2/3 (Western blot) de una manera dependiente de la dosis.

Las Figuras 8A-8D son gráficas. Las Figuras 8A-8B muestran que el silenciamiento de la expresión de Endogлина atenúa la expresión de ARNm CTGF y PAI-1 inducida por TGFβ1 en fibroblastos cardíacos humanos. La Figura 8C muestra que la Endogлина soluble humana recombinante (RhsEng) atenúa la expresión de ARNm del colágeno Tipo I inducido por TGFβ1 de una manera dependiente de la dosis en hCF. La Figura 8D muestra que las células COS-7 transfectadas con AdhsEng demuestran un incremento de una manera dependiente de la dosis en los niveles de sEng detectados en un medio de cultivo.

Las Figuras 9A-9D son gráficas, imágenes, y un diagrama esquemático que muestran que la sobre-expresión de sEng humana limita la fibrosis cardíaca in vivo. La Figura 9A es una gráfica que muestra que inyecciones intravenosas de AdhsEng incrementan los niveles circulantes de Endogлина soluble humana en ratones WT sin afectar a los niveles de sEng de ratón. La Figura 9B es una imagen histológica representativa que muestra una menor tinción de picrosirius red para el colágeno en ratones WT tratados con AdhsEng en comparación con los ratones tratados con adenovirus nulo (AdNull). La Figura 9C es una gráfica que muestra que los niveles de ARNm de colágeno Tipo I del LV se reducen significativamente en ratones WT tratados con AdhsEng en comparación con los controles AdNull. La Figura 9D es un diagrama esquemático que demuestra que la expresión reducida de mEng en ratones Eng^{+/-} atenúa la expresión de colágeno Tipo I y pSmad-2/3 inducido por TGFβ1, limitando de este modo la fibrosis cardíaca. El tratamiento con sEng reproduce la condición de déficit de Endogлина mediante la reducción de la expresión de colágeno Tipo I y pSmad-2/3. La Endogлина Soluble puede, por lo tanto, servir como un ligando colector para TGFβ1.

La Figura 10 son las secuencias de aminoácidos del precursor de la isoforma 1 de Endogлина y el precursor de la isoforma 2 de Endogлина.

Descripción detallada

Hemos descubierto que la Endogлина soluble actúa como un regulador negativo de la señalización de TGFβ1 a través del receptor de Endogлина y que la inhibición empleando Endogлина soluble (sEng) da como resultado una reducción en la fisiopatología asociada con la insuficiencia cardíaca, particularmente con la fibrosis cardíaca. En base a este descubrimiento, la presente invención caracteriza una composición que comprende un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o es un antagonista del receptor de Endogлина, para usar en un método para tratar o tratar profilácticamente la insuficiencia cardíaca, disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, fibrosis ventricular derecha debido a hipertensión pulmonar, cardiomiopatía, o un post infarto de miocardio en un sujeto, en donde dicho sujeto está padeciendo o ha padecido una enfermedad arterial coronaria o caracteriza a una composición que comprende un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o es un antagonista del receptor de Endogлина, para usar en un método para reducir la fibrosis en un sujeto.

Endogлина

La Endogлина (Eng; CD105) es una glicoproteína dimérica asociada a la membrana (mEng) de 180 kDa que se encuentra también como una forma circulante compuesta del dominio extracelular, conocida como Endogлина soluble (sEng). La Endogлина juega un papel importante en el remodelado vascular. Bajo condiciones basales el endotelio vascular responde a TGFβ1 a través del receptor de tipo II TGF-β en asociación con cualquiera de los receptores de

señalización de tipo I conocidos como quinasa similar a activina (ALK) 1 y ALK5, que promueven bien un fenotipo proliferativo o bien un fenotipo quiescente, respectivamente. La Endogлина modula las respuestas hacia TGFβ1 y está implicada en la regulación de intercambio de las rutas de señalización de ALK5 a ALK1.

- 5 El papel de Endogлина como un modulador de la señalización de TGFβ1 en fibroblastos cardíacos y en la insuficiencia cardíaca, donde la fibrosis juega un papel principal, no se había explorado antes de la presente invención. Aunque varias líneas de evidencias sugieren que la Endogлина juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis vascular (López-Novoa et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299:H959-74, 2010), el papel de Endogлина en el remodelado cardíaco y en la insuficiencia cardíaca se había mantenido ignorada en gran parte.

TGFβ1, Endogлина, e insuficiencia cardíaca

- 10 TGFβ1 es una potente citoquina posicionada de manera central entre procesos críticos conocidos por modular la hipertrofia y la fibrosis del cardiomiocito. Como se describe a continuación, la Endogлина juega un papel importante en la fisiopatología del remodelado cardíaco en insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Identificando primero la expresión cardíaca de Endogлина, una proteína reguladora crítica para la señalización de TGFβ1, limitada principalmente a poblaciones celulares que no son cardiomiocitos, fuimos capaces de estudiar los efectos reducidos de señalización de TGFβ1 en fibroblastos cardíacos in vivo. De forma similar a nuestras observaciones en sujetos humanos con insuficiencia cardíaca, observamos una expresión aumentada de mEng y sEng en un modelo de ratón con insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. De manera importante, cuando comparamos frente a los controles WT, el patrón de la expresión de mEng y sEng fueron similares en ratones Eng^{+/-} sometidos a TAC; sin embargo, los niveles de expresión fueron significativamente más bajos. La expresión reducida de mEng se correlaciona con un fenotipo cardíaco pro-superviviente a la insuficiencia cardíaca y se asoció con hipertrofia del cardiomiocito preservada, un modesto incremento en la capilaridad del miocardio, y una fibrosis cardíaca reducida significativamente. Nosotros demostramos después la dependencia de la señalización de TGFβ1 sobre la expresión de mEng en fibroblastos cardíacos humanos empleando estudios de pérdida funcional. Paradójicamente, la sobre-expresión de mEng atenuada de una manera similar a TGFβ1 induce la síntesis de colágeno Tipo I e implica a la sEng como un inhibidor autocrino de la actividad de TGFβ1 en hCF. El tratamiento con sEng bien como un péptido recombinante o bien mediante la sobre-expresión adenoviral in vitro reflejó la condición deficiente de Endogлина mediante la limitación de la señalización de TGFβ1 y de la síntesis de colágeno Tipo I. Finalmente, comenzamos a explorar la utilidad clínica potencial de sEng sobre la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión y observamos una fibrosis cardíaca reducida en ratones tratados con una sEng humana que sobre-expresa adenovirus. En conjunto, estos resultados identifican a la Endogлина como un participante importante en la biología de la fibrosis y el remodelado cardíacos (Figura 5D) y como una nueva diana terapéutica potencial para mejorar la supervivencia en la insuficiencia cardíaca.

- 35 Observamos que en ratones Eng^{+/-} el fenotipo pro-supervivencia es similar al de los modelos de hipertrofia fisiológica anteriormente descritos, mediante los cuales la hipertrofia de cardiomiocitos se apoya mediante el incremento paralelo en la capilaridad del miocardio. En nuestro modelo, la observación más exhaustiva fue una pérdida cercana a la totalidad de la fibrosis cardíaca sin afectar a la hipertrofia cardíaca. Se observó también una supervivencia mejorada en los estudios preclínicos y clínicos de terapia anti-fibrótica en la insuficiencia cardíaca (Zannad et al., *Circulation* 102:2700-6, 2000; Kuwahara et al., *Circulation* 106:130-5, 2002). En nuestro modelo, no sólo se observó una mejor supervivencia, sino también una función cardíaca preservada y sin dilatación cardíaca a pesar de la sobrecarga crónica de presión en el LV. Estos resultados destacan la importante contribución de la fibrosis cardíaca para afectar al remodelado cardíaco y en la patogénesis de la cardiomiopatía dilatada en la etapa final.

- 45 Se cree que la Endogлина soluble es el resultado de la separación proteolítica del dominio extracelular de Endogлина de la metaloproteinasas de la matriz 14 (MT1-MMP). Una vez liberado, la sobre-expresión del dominio extracelular de Endogлина regula negativamente la actividad de TGFβ1 (Venkatesha et al., *Nat. Med.* 12:642-9, 2006; Letamendia et al., *J. Biol. Chem.* 273:33011-9, 1998), donde sEng puede servir como un ligando colector para TGFβ1 (Venkatesha et al., *Nat. Med.* 12:642-9, 2006) (Figura 5D). Nuestros datos muestran que sEng es un regulador negativo importante de la actividad de TGFβ1 en fibroblastos cardíacos humanos, como se evidencia mediante la expresión reducida de pSmad-2/3 y de colágeno Tipo 1. La propagación de sEng en la insuficiencia cardíaca puede, por tanto, servir como un mecanismo protector para reducir la estimulación de la fibrosis cardíaca por TGFβ1.

- 50 sEng puede unirse también a miembros de la familia TGFβ pro-angiogénicos, tales como BMP9 y, de este modo, regular negativamente la angiogénesis tisular (Castonquay et al., *J. Biol. Chem.* 286:30034-46, 2011), lo que es coherente con nuestras observaciones, como observamos con una densidad capilar del miocardio aumentada en ratones Eng^{+/-}, que manifestaron niveles significativamente menores de sEng a través de todas las fases de sobrecarga de presión cardíaca, a pesar de la expresión variable de mEng en cada punto de tiempo.

- 55 Además, observamos que incrementó la expresión de pSmad-1/5/8 en ratones Eng^{+/-} sometidos a TAC en comparación con los controles WT, sugiriendo que otros ligandos de la familia TGFβ pueden ser más activos en ratones Eng^{+/-}. Por tanto, la expresión reducida de mEng puede promover la supervivencia mediante limitación de la fibrosis cardíaca in vivo, mientras que la expresión reducida de sEng promueve la capilaridad del miocardio mediante la limitación del ligando colector de citoquinas pro-angiogénicas, tal como BMP9. Finalmente, la sobre-expresión de sEng puede limitar la fibrosis cardíaca y el remodelado adverso en la insuficiencia cardíaca mediante la replicación

de la condición deficiente de Endogлина. En conjunto, nuestros datos destacan que el equilibrio entre la expresión de mEng frente a la de sEng es importante en la regulación del remodelado cardíaco en la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

5 Otro descubrimiento importante es que Endogлина juega un papel en la promoción de la fosforilación de pSmad-2/3 y la posterior fibrosis cardíaca (Figura 5F). Varios informes anteriores han demostrado que pSmad-2/3 promueve la fibrosis cardíaca y el remodelado adverso (Letamendia et al., *J. Biol. Chem.* 273:33011-9, 1998; Dobaczewski et al., *Circ. Res.* 107:418-28, 2010). En apoyo de nuestras observaciones, los ratones geno-suprimidos condicionalmente del receptor TGFβ Tipo II (TBR2^{CKD}) sometidos a TAC demuestran fibrosis intersticial cardiaca reducida, mejora de la capilaridad del miocardio, y función cardíaca preservada (Huang et al., *Hypertension* 55:1165-71, 2010). En comparación con los controles, los niveles de pSmad3 se redujeron también en ratones TBR2^{CKD} después de TAC. Debido a que Endogлина requiere TBRII para unirse al ligando TGFβ1 de manera eficaz (Barbara et al., *J. Biol. Chem.* 274:584-94, 1999), nuestro modelo replica estrechamente el fenotipo de ratones TBR2^{CKD} después de TAC y observamos una pérdida similar de la expresión de pSmad-2/3 en ratones Eng^{+/-}. Además, los ratones que carecen de la expresión del receptor Tipo 2 de la proteína morfogénica ósea (BMPR2^{-/-}) se ha estudiado como modelo de la hipertensión pulmonar. En estos ratones, la expresión reducida de pSmad-1/5/8 se asocia con fallo del ventrículo derecho (RV) en presencia de sobrecarga de presión RV crónica (Koitabashi et al., *J. Clin. Invest.* 121:2301-12, 2011; Upton et al., *J. Biol. Chem.* 284:15794-804, 2009). Los ligandos para BMPR-2, tal como BMP7 han demostrado también un potente efecto anti-fibrótico en modelos de insuficiencia cardíaca de ratón (Long et al., *Circulation* 119:566-76, 2009), otro respaldo del concepto que promueve que la actividad de pSmad-1/5/8 puede tener efectos beneficiosos en la función cardíaca. Tomados en conjunto, los resultados asociados con los modelos de ratón TBRII^{CKD} y BMPR2^{-/-} destacan los efectos beneficiosos de un menor Smad-2/3 y una mejor señalización de Smad-1/5/8. De manera importante, Endogлина puede unir ligandos asociados con TBRII y BMPR2, tales como TGFβ1 y BMPs-2, -4, -7, y -9 (Zeisberg et al., *Nat. Med.* 13:952-61, 2007), posicionando, por tanto, este receptor auxiliar en una localización crítica entre estos receptores importantes Tipo II que dan una señal a través de Smad-2/3 y Smad-1/5/8, respectivamente.

En conclusión, la Endogлина regula el remodelado cardíaco en respuesta a una sobrecarga de presión de LV. Nuestros resultados destacan los papeles opuestos de mEng y sEng como moduladores de la actividad de TGFβ1 en fibroblastos cardíacos. Además, la redundancia de ligandos, receptores, y proteínas efectoras de Smad descendente apoya además la importancia de nuestra observación de que Endogлина juega un papel importante en la mediación de la señalización de TGFβ1 a través de pSmad-2/3. Por tanto, las terapias que se dirigen a la biología de Endogлина en la insuficiencia cardíaca pueden mejorar los resultados clínicos en individuos afectados por esta devastadora afección.

Tratamiento de un sujeto que padece de insuficiencia cardíaca o una enfermedad relacionada

35 Las composiciones para usar según la presente invención se emplean para tratar o tratar profilácticamente a sujetos, en donde dicho sujeto padece o ha padecido de una enfermedad arterial coronaria, de insuficiencia cardíaca, disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, fibrosis ventricular derecha debido a hipertensión pulmonar, cardiomiopatía, o post infarto de miocardio, particularmente aquellos que se asocian con, o están causados por, fibrosis cardíaca, o para reducir la fibrosis en un sujeto.

40 La insuficiencia cardíaca ocurre cuando el corazón no puede bombear suficiente sangre al resto del cuerpo. La insuficiencia cardíaca comúnmente es causada por una enfermedad arterial coronaria pero puede resultar también de otras causas, que incluyen cardiomiopatía (debilidad del músculo cardíaco por infección), enfermedad cardíaca congénita, ataque cardíaco, enfermedad de la válvula cardíaca, y determinadas arritmias. Otras enfermedades que pueden contribuir a la insuficiencia cardíaca incluyen enfisema, tiroides hiperactiva, anemia grave, y tiroides hipoactiva. Las composiciones para usar según la invención se pueden usar en el tratamiento o el tratamiento profiláctico de un sujeto que padece de cualquiera de estas afecciones o enfermedades.

50 Los síntomas de la insuficiencia cardíaca incluyen tos, fatiga, debilidad, desmayos, pérdida de apetito, necesidad de orinar durante la noche, pulso rápido o irregular o palpitaciones cardíacas, dificultad para respirar después de una actividad o después de acostarse, inflamación del hígado o del abdomen, pies, tobillos o piernas hinchados, despertarse después de un par de horas de sueño debido a la dificultad para respirar, ganancia de peso, venas del cuello inflamadas, y acumulación de fluido en los pulmones. Las composiciones para usar según la invención se pueden usar para tratar cualquiera de estos síntomas.

Otras enfermedades que se pueden tratar empleando las composiciones para usar según la invención incluyen la disfunción del ventrículo izquierdo (por ejemplo, asintomático después de un infarto de miocardio), hipertensión (por ejemplo, hipertensión adulta o pediátrica), y post infarto de miocardio.

55 Endogлина Soluble

Para tratar o tratar profilácticamente las afecciones referidas en la presente invención, se pueden usar la Endogлина soluble, un fragmento de Endogлина soluble, o un análogo de Endogлина soluble, por ejemplo, un fragmento o un análogo que mantenga la capacidad de unirse a TGFβ1, sin embargo, la Endogлина soluble, un fragmento de

Endoglina soluble, o un análogo de Endoglina soluble, no se comprenden por las composiciones para usar según la presente invención.

La Endoglina de longitud completa es un co-receptor homodimérico de 180 kDa para miembros de la superfamilia TGF- β . Se conocen dos isoformas de Endoglina: una proteína de 633 aminoácidos y una proteína de 600 aminoácidos. Estas dos formas difieren en la longitud de su cola citoplasmática; la forma más larga tiene 47 aminoácidos de cola (L-mEng), mientras que la forma más corta tiene una cola citoplasmática de 14 aminoácidos (S-mEng). Las secuencias de aminoácidos de Endoglina se describen en los números de acceso de la NCBI NP_001108225 y NP_000109.1 y se muestran en la Figura 10. Las secuencias de Endoglina maduras incluyen de 26 a 658 aminoácidos de la isoforma 1 y de 26-625 aminoácidos de la isoforma 2. En ambas isoformas, los aminoácidos 587 a 611 se predice que estén en el dominio transmembrana. Por lo tanto, se pueden emplear en la invención, la región extracelular correspondiente (de 26 a 586 ó de 27 a 586 aminoácidos) de Endoglina, fragmentos de la misma, o análogos de la misma.

Un fragmento de Endoglina soluble (por ejemplo, cualquiera de los que se describen en la presente invención) puede ser capaz de unirse a TGF β 1, por ejemplo, con al menos el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de la afinidad de unión de Endoglina soluble o la forma de Endoglina soluble que aparece de forma natural.

Un análogo de Endoglina soluble puede tener al menos el 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o el 99% de identidad de secuencia que la Endoglina soluble o del fragmento de la Endoglina soluble. Tales análogos pueden ser capaces de unirse a TGF β 1, por ejemplo, con al menos el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% de la afinidad de unión de la Endoglina soluble.

Anticuerpos

Las composiciones para usar según la invención pueden emplear un anticuerpo que prevenga la actividad de Endoglina mediante TGF β 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a mEng o a sEng. El anticuerpo se puede unir específicamente al dominio extracelular (ECD) de mEng, al componente asociado a la membrana residual de mEng después de la separación del ECD, o a la sEng circulante. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo está humanizado. El anticuerpo o el fragmento del anticuerpo puede ser un anticuerpo de una única cadena (scFv), Fab, Fab'2, scFv, SMIP, diabody, nanocuerpo, aptámero, o anticuerpo de dominio.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, poli-específicos o mono-específicos) frente a Endoglina (por ejemplo, anticuerpos antagonistas) se pueden producir empleando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para fabricar anticuerpos. En un ejemplo, la secuencia de Endoglina relevante se produce como una fusión C-terminal con glutatión-S-transferasa (GST) (Smith et al., *Gene* 67:31-40, 1988). La proteína de fusión se purifica sobre perlas de glutatión-sefarosa, se eluye con glutatión, se separa con trombina (en un sitio de separación de ingeniería genética), y se purifica para la inmunización de conejos. Las inmunizaciones primarias se llevan a cabo con adyuvante completo de Freund y las inmunizaciones posteriores con el adyuvante incompleto de Freund. Los títulos del anticuerpo se monitorean mediante Western blot y análisis de inmunoprecipitación empleando el fragmento proteico de separación a trombina de la proteína de fusión GST. El suero inmunológico se purifica por afinidad empleando una proteína acoplada a sefarosa y CNBr. La especificidad del antisero se puede determinar empleando un grupo de proteínas GST desvinculadas.

Alternativamente, se pueden preparar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a Endoglina, empleando tecnología del hibridoma estándar (véase, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495-7, 1975; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:511-9, 1976; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:292-5, 1976; Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981). Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales se pueden ensayar también para el reconocimiento específico mediante Western blot o análisis de inmunoprecipitación. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar empleando el polipéptido descrito anteriormente y una biblioteca de exposición de fagos (Vaughan et al., *Nat. Biotechnol.* 14:309-14, 1996).

Para generar anticuerpos policlonales a gran escala y a bajo coste, se pueden elegir especies animales determinadas. Los anticuerpos policlonales se pueden aislar a partir de leche o calostro de, por ejemplo, vacas inmunizadas. El calostro de vaca contiene 28 g de IgG por litro, mientras que la leche de vaca contiene 1,5 g de IgG por litro (Ontsouka et al., *J. Dairy Sci.* 86:2005-11, 2003). Los anticuerpos policlonales se pueden aislar también a partir de la yema de los huevos de pollos inmunizados (Sarker et al., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32:19-25, 2001).

Anticuerpos útiles se pueden identificar en varios ensayos de cribado diferentes. Primero, los anticuerpos se ensayan mediante ELISA para determinar si son específicos para el antígeno inmunizante (es decir, la Endoglina). Empleando técnicas estándar, las placas de ELISA se recubren con el inmunógeno, se añade el anticuerpo a la placa, se lava, y se detecta la presencia del anticuerpo unido mediante el empleo de un segundo anticuerpo específico para la Ig de las especies en las que se generó el anticuerpo.

ARN de interferencia

El ARNi se puede emplear para inhibir la expresión de Endoglina. Sin embargo, el ARNi no está comprendido por la presente invención. El ARN de interferencia (ARNi, de sus siglas en inglés) es un mecanismo de silenciamiento genético post-transcriptional (PTGS) en el que el ARN bicatenario (ARNds) correspondiente a un gen o a un ARNm de interés, se introduce en un organismo, dando como resultado la degradación del ARNm correspondiente. En la reacción del ARNi, tanto la hebra sentido como la antisentido de una molécula de ARNds se procesan en fragmentos o segmentos de ARN pequeño que oscilan en una longitud de 21 a 23 nucleótidos (nt) y que tienen colas 3' de 2 nucleótidos. Alternativamente, los ARNds sintéticos, que tienen de 21 nt a 23 nt de longitud y que tienen colas 3' de 2 nucleótidos, se pueden sintetizar, purificar, y usar en la reacción. Estos ARNds de 21 a 23 nt se conocen como "ARNs guía" o "ARNs cortos de interferencia" (siARNs).

Los duplos de ARNsi se unen después a un complejo nucleasa compuesto de proteínas que se dirigen y destruyen los ARNms endógenos que tienen homología del ARNsi dentro del complejo. El complejo funciona dirigiéndose a la molécula de ARNm homóloga a través de interacciones de pares de bases entre una de las hebras ARNsi y el ARNm endógeno. El ARNm se separa después aproximadamente 12 nt a partir del extremo 3' del ARNsi y se degrada. De esta manera, se pueden dirigir y degradar genes específicos, dando como resultado de este modo una pérdida de la expresión proteica desde el gen diana. Los ARNsi se pueden sintetizar también u obtener químicamente a partir de una compañía que sintetiza químicamente ARNsi (por ejemplo, Dharmacon Research Inc., Pharmacia, o ABI).

Las moléculas de ARNi de Endoglina están disponibles comercialmente y se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes, que incluyen la Biotecnología de Santa Cruz (ARNsi; Cat. N°. sc-35302).

Los requerimientos específicos y las modificaciones de los ARNds se describen en la Publicación PCT N° WO 01/75164, y en la Solicitud de Patente U.S Publicación N° 20060067937 y la Solicitud PCT N° WO 06/034507.

Administración y dosis

El método comprendido dentro de las composiciones para usar en un método según la invención proporciona la administración de una composición que comprende un anticuerpo específico de Endoglina, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, que inhibe la actividad de Endoglina o es un antagonista del receptor de Endoglina. La composición se puede formular para usarse en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Se pueden incluir también una variedad de excipientes o vehículos aceptables fisiológicamente en la composición para una formulación adecuada. Formulaciones adecuadas para usar en la presente invención se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed., 1985. Para una revisión breve de los métodos de administración de fármacos, véase, por ejemplo, Langer (*Science* 249:1527-1533, 1990).

La composición farmacéutica se puede emplear para administración parenteral, intranasal, tópica, oral, o local, tal como por medios transdérmicos, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La composición farmacéutica se puede administrar de forma parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, o subcutánea), o mediante ingestión oral, o mediante aplicación tópica o inyección intra-articular en las áreas afectadas por la afección vascular o cancerosa. Vías de administración alternativas incluyen la administración intravascular, intraarterial, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, así como la nasal, oftálmica, intra-escleral, intraorbital, rectal, tópica, o mediante inhalación en aerosol. También está incluida específicamente en la invención la administración de liberación sostenida, mediante medios tales como las inyecciones depot o implantes o componentes erosionables. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que incluyen los agentes anteriormente mencionados disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, suero, PBS, y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente cuando sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tal como ajuste del pH y agentes reguladores, agentes reguladores de la tonicidad, agentes edulcorantes, detergentes y similares. La invención proporciona también composiciones para administración oral, que pueden contener ingredientes inertes, tales como aglutinantes o rellenos para la formulación de un comprimido, una cápsula, y similares. Además, esta invención proporciona composiciones para administración local, que pueden contener ingredientes inertes, tales como disolventes o emulsionantes para la formulación de una crema, una pomada, y similares.

Estas composiciones se pueden sintetizar mediante técnicas de esterilización convencional o se pueden filtrar de forma estéril. Las disoluciones acuosas resultantes se pueden envasar para usarse como tal o se pueden liofilizar, estando la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y lo más preferiblemente entre 7 y 8, tal como de 7 a 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida se pueden envasar en unidades de dosificación en solitario múltiples, cada una contiene una cantidad fija del agente o agentes anteriormente mencionados, tal como en un envase sellado de comprimidos o cápsulas. La composición en forma sólida se puede envasar también en un envase para una cantidad flexible, tal como un tubo comprimible diseñado para una crema o pomada aplicable de manera tópica.

Las composiciones que contienen una cantidad eficaz se pueden administrar para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones profilácticas, las composiciones se pueden administrar a un sujeto diagnosticado por

tener un riesgo de insuficiencia cardíaca (por ejemplo, que tienen niveles bajos de Endogлина soluble, como se describe en la Solicitud de patente U.S. N° 13/288.493). Las composiciones para usar según la invención se pueden administrar al sujeto (por ejemplo, un ser humano) en una cantidad suficiente para retrasar, reducir, o preferiblemente prevenir el inicio del trastorno. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que ya padece de insuficiencia cardíaca de cualquiera de los trastornos descritos en la presente memoria, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas del trastorno y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este propósito se define como una "cantidad eficaz terapéuticamente", una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente al menos un síntoma asociado con la enfermedad o una afección médica. Por ejemplo, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, un agente o compuesto será eficaz terapéuticamente si reduce, retrasa, suprime, o detiene cualquier síntoma de la afección. Una cantidad eficaz terapéuticamente de un agente o un compuesto no se requiere para curar una enfermedad o afección pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o afección tal que el inicio de la enfermedad o afección se retrase, dificulte, o prevenga, o los síntomas de la enfermedad o afección se mejoren, o se cambie el término de la enfermedad o afección o, por ejemplo, sea menos grave o se acelere la recuperación en un individuo.

Las cantidades eficaces para este uso pueden depender de la gravedad de la enfermedad o afección y del peso y estado general del sujeto. La cantidad eficaz terapéuticamente de las composiciones para usar según la invención aplicada a mamíferos (por ejemplo, seres humanos) se puede determinar por el médico tratante considerando las diferencias individuales de edad, peso, y la afección del mamífero. Los agentes se administran a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) en una cantidad eficaz, que es una cantidad que produce un resultado deseable en un sujeto tratado (por ejemplo, reducción de la fibrosis cardíaca). Las cantidades eficaces terapéuticamente se pueden determinar también empíricamente por los expertos en la técnica.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones para usar según la invención que incluyen una cantidad eficaz se pueden llevar a cabo con niveles de dosificación y patrones que se seleccionan por el médico tratante. La dosis y el programa de administración se pueden determinar y ajustar en base a la gravedad de la enfermedad o afección en el sujeto, que se puede monitorear a través del transcurso del tratamiento según los métodos practicados comúnmente por los clínicos o los descritos en la presente memoria.

Las composiciones para usar según la presente invención se pueden emplear en combinación con cualquiera de los otros métodos de tratamiento o terapia o se pueden emplear por separado o a partir de métodos de tratamiento o terapia convencionales.

Cuando las composiciones para usar según esta invención se administran en terapias de combinación con otros agentes, se pueden administrar a un individuo de forma secuencial o concurrente. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una combinación de una composición para usar según la presente invención en asociación con un excipiente aceptable farmacéuticamente, como se describe en la presente memoria, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, en lugar de limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión de Endogлина en el fibroblasto cardíaco durante la sobrecarga de presión del ventrículo izquierdo

Para investigar el papel de la Endogлина en la insuficiencia cardíaca, primero se demostró que la Endogлина se expresa principalmente mediante poblaciones aisladas que no son cardiomiocitos incluyendo a fibroblastos cardíacos y endotelio (Figura 1A). Después empleamos el modelo de ratón bien establecido de la sobrecarga de presión LV inducida por la constricción de la aorta torácica (TAC), seguido de la caracterización del tejido a las dos, cuatro, y diez semanas de la insuficiencia cardíaca. En comparación con los ratones WT, la expresión de Endogлина de referencia en el LV era significativamente más bajo en ratones Eng^{+/-} (Figura 1B). Después de la TAC, el ARNm y la expresión proteica de mEng LV eran significativamente menores a las dos semanas, después permanecían elevados a las cuatro semanas tras la TAC, y se volvían casi normales a las diez semanas en ratones WT (Figuras 1C y 1D). No se observó cambio en la expresión de Endogлина en la aorta distal para el sitio de la ligadura de TAC (Figura 2). Los niveles séricos de sEng se elevaron también dentro de las dos semanas y se normalizaron a las cuatro y diez semanas después de la TAC (Figura 1E). En ratones Eng^{+/-}, la expresión general de mEng y sEng eran significativamente inferiores en comparación con la de los ratones WT (Figuras 1C-1E). Los ratones Eng^{+/-}, sin embargo, mostraron un patrón de expresión similar al de los ratones WT. El ARNm y la expresión proteica de mEng LV aumentaron a las dos semanas tras la TAC y se redujeron a niveles casi normales a las cuatro y diez semanas. En todos los puntos de tiempo, los niveles de sEng eran inferiores en ratones Eng^{+/-} en comparación con los ratones WT. Estos resultados sugieren que la sobrecarga de presión estimula directamente la expresión de mEng del ventrículo izquierdo sin afectar a la expresión sistémica de mEng. Durante la fase aguda de sobrecarga de presión, los niveles de sEng aumentaron de manera acorde con los niveles de mEng LV en ratones WT, sugiriendo un posible origen cardíaco para esta forma circulante de Endogлина. De manera importante, los ratones Eng^{+/-} mostraron

niveles reducidos de la expresión de mEng y sEng en respuesta a la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

Ejemplo 2

La expresión reducida de Endoglina promueve un fenotipo cardíaco de pro-supervivencia en la insuficiencia cardíaca

5 A continuación examinamos el impacto funcional de la expresión reducida de Endoglina durante la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Los ratones Eng^{+/-} mostraron una función cardíaca preservada mediante electrocardiograma y análisis de ciclos de volúmenes-presión y una mejor supervivencia en comparación con los ratones WT después de la TAC (88% frente al 50%, respectivamente, p<0,01) (Figuras 1I-1J). En consonancia con estas observaciones, los ratones WT manifiestan un peso corporal total significativamente reducido tanto a las cuatro como a las diez semanas después de la TAC, mientras que los ratones Eng^{+/-} no lo hicieron (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados fisiológicos en ratones WT frente a Eng^{+/-} después de la TAC

Masa	Simulación	TAC	
		4 semanas	10 semanas
Peso corporal total (g)			
WT	35±3,9	29±3,1*	26±2,2**
Eng ^{+/-}	34±1,2	34±4,6 #	35±3,7 #
Peso LV (g)/ Longitud de la tibia (mm)			
WT	0,007±0,001	0,011±0,0001*	0,015±0,002**
Eng ^{+/-}	0,005±0,0007 #	0,009±0,001* #	0,011±0,001 #
Peso pulmonar total (g)			
WT	0,009±0,0007	0,24±0,01*	0,023±0,005**
Eng ^{+/-}	0,008±0,0003 #	0,019±0,01*	0,015±0,005** #
Datos hemodinámicos			
Latido cardíaco (latidos/min)			
WT	535±45	553±40	573±93
Eng ^{+/-}	549±32	522±49	547±32
Presión Sistólica final LV (mmHg)			
WT	115±12	130±22	98±42
Eng ^{+/-}	99±15	157±19 * #	167±14 * #
Presión Diastólica final LV (mmHg)			
WT	11±4	31±7 *	23±7 *
Eng ^{+/-}	9±5	24±12 *	25±4 *
dP/dtmax			
WT	9000±1263	5184±1092 *	3959±1980 *
Eng ^{+/-}	8141±1183	7127±2615 #	7015±712 #
dP/dtmin			
WT	8288±1446	5614±1195 *	3954±1955 *

Eng ^{+/-}	8015+1563	7281+2204 #	7336+907 #
Datos electrocardiográficos			
Diámetro Diastólico final LV (mm)			
WT	2,4+0,4	3,9+0,4 *	4,5+1,8 *
Eng ^{+/-}	1,8+0,1 #	3,4+0,6 *	2,6+0,03 * #
Reducción fraccionaria (%)			
WT	72+9	42+4 *	18+15 *
Eng ^{+/-}	57+8 #	40+7	67+10 #
Grosor de la pared posterior (mm)			
WT	0,9+0,2	1,4+0,3 *	1,3+0,3 *
Eng ^{+/-}	0,5+0,04 #	1,3+0,2 *	2,3+0,1 * #

*p<0,05: 4 semanas frente a antes de TAC ; ** p<0,05: 10 semanas frente a antes de TAC; #, p<0,05: Eng^{+/-} frente a WT

Comparando los pesos de referencia, los pesos pulmonares eran significativamente mayores en ambos grupos de ratones en todos los periodos de TAC; sin embargo, los pesos pulmonares eran inferiores en ratones Eng^{+/-} a las diez semanas después de la TAC en comparación con los ratones WT (Tabla 1). Tanto a las cuatro como a las diez semanas después de la TAC, la presión sistólica final LV (LVSP) como la presión diastólica final LV (LVEDP) se aumentaron tanto en ratones WT como en ratones Eng^{+/-} en comparación con sus respectivos controles de simulación. Aunque la LVEDP no era significativamente diferente entre los ratones WT y los Eng^{+/-}, la LVSP era significativamente mayor en ratones Eng^{+/-} en comparación con los WT tanto a las cuatro como a las diez semanas después de la TAC. La contractibilidad del LV (dP/dt_{max}) descendió significativamente de una manera dependiente del tiempo en ratones WT después de la TAC, pero se mantuvo sin cambios en todas las fases de sobrecarga cardíaca en ratones Eng^{+/-} (Tabla 1). El electrocardiograma demostró una reducción dependiente del tiempo significativa de la reducción fraccionaria (FS%) en ratones WT, pero no en ratones Eng^{+/-} después de la TAC. Junto con la función LV preservada, se apuntó un incremento significativo del grosor de la pared posterior del LV (PWT) tanto en ratones WT como Eng^{+/-} después de la TAC en comparación con los valores de referencia. Sin embargo, a las diez semanas después de la TAC, los ratones WT mostraron una dilatación del LV significativamente mayor y menos PWT en comparación con los ratones Eng^{+/-} (Tabla 1). Estos resultados sugieren que a pesar de grados idénticos de sobrecarga de presión LV, la expresión reducida de Endogлина conservó la función del LV y mejoró la supervivencia en todos los puntos de tiempo. Especialmente, en comparación con los ratones WT, las mediciones del electrocardiograma del grosor del LV fueron similares; sin embargo, la capacidad del LV para generar presión sistólica era significativamente mayor en ratones Eng^{+/-}, sugiriendo que se puede alterar algún componente del remodelado cardíaco diferente a la hipertrofia cardíaca mediante la expresión reducida de Endogлина.

Ejemplo 3

La expresión reducida de Endogлина atenúa la fibrosis cardíaca

Para investigar la posibilidad de que la expresión Endogлина reducida atenúa la fibrosis cardíaca, examinamos los cambios en la hipertrofia cardíaca. En comparación con los controles de simulación, la masa del LV normalizado era significativamente inferior en todas las fases de la sobrecarga de presión del LV tanto en ratones WT como Eng^{+/-}. Durante la fase tardía de la insuficiencia cardíaca, la masa del LV era significativamente inferior en ratones Eng^{+/-} en comparación con los ratones WT, reflejando posiblemente la falta de dilatación del LV y de remodelado excéntrico (Tabla 1). De manera similar, el área transversal del miocito era significativamente mayor tanto en ratones Eng^{+/-} como WT después de la TAC (Figuras 3A-3B). La expresión de los genes fetales y de las proteínas conocidas por activarse en la insuficiencia cardíaca, tal como β-MHC, SERCa, y calcineurina mostraron patrones de expresión similares tanto en ratones Eng^{+/-} como WT después de cuatro semanas (Figuras 3C-3E) y diez semanas después de la TAC (Figuras 4A-4B). A continuación, examinamos la capilaridad del miocardio después de cuatro semanas tras la TAC, donde ambos grupos de ratón manifiestan grados similares de hipertrofia del LV y se observa un incremento significativo en la capilaridad para las proporciones del cardiomiocito y la densidad capilar total en ratones WT y Eng^{+/-} después de la TAC. Ambas mediciones de la capilaridad del miocardio eran mayores en ratones Eng^{+/-} en comparación con los WT después de la TAC (Figuras 3F-3G). En base a la observación de que la hipertrofia del miocito era similar entre los grupos y que la capilaridad del miocardio era sólo modestamente superior en ratones Eng^{+/-}, a continuación examinamos los cambios en la fibrosis cardíaca.

En comparación con los controles de simulación, la cuantificación del depósito de colágeno evidente histológicamente en el LV aumentó de una manera dependiente del tiempo en ratones WT, mientras que el cambio

no era significativo en ratones Eng^{+/-} (Figuras 5A-5B). El ARNm y la expresión proteica de colágeno Tipo 1 (Figura 5C) (Figura 5D) estaban aumentadas de manera similar en ratones WT después de la TAC, mientras que los ratones Eng^{+/-} sólo mostraban un pequeño incremento en la expresión de colágeno Tipo 1 durante las etapas tardías de la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión (Figuras 5C y 6A). De manera importante, se observó un aumento del ARNm de TGFβ1 (Figura 5E) y de la expresión de proteína TGFβ1 (Figura 6B) en el LV tanto de los grupos WT como Eng^{+/-} cuatro semanas después de la TAC. A las diez semanas, la expresión de ARNm de TGFβ1 permaneció elevado en ratones WT tras la TAC en comparación con los ratones WT de simulación; sin embargo, no se observó cambio en los ratones Eng^{+/-} en comparación con los controles de simulación (datos no mostrados). La expresión de las dianas descendentes de señalización de TGFβ1, tal como Smad-2/3 fosforilada (Figura 5F) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) (Figura 6C), eran significativamente mayores en ratones WT después de la TAC en comparación con los controles de simulación. Sin embargo, no se observaron diferencias en los ratones Eng^{+/-} con TAC en comparación con los controles. De manera interesante, los niveles de Smad-1/5/8 fosforilados en ratones WT no estaban elevados significativamente, pero estaban elevados en ratones Eng^{+/-} después de cuatro semanas de la TAC (Figura 6D). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la expresión reducida de Endogлина conserva la señalización hipertrófica del miocito, mientras que limita las cascadas de señalización pro-fibrogénicas. Además, a pesar de un incremento similar en los niveles de TGFβ1, la pérdida del receptor TGFβ1 de tipo III, Endogлина, era suficiente para atenuar la transducción de señales descendentes, como se evidencia mediante los niveles reducidos de pSmad-2/3 y PAI-1. Estas observaciones in vivo nos condujeron a investigar la dependencia de la señalización pro-fibrótica de TGFβ1 sobre la expresión in vitro de Endogлина.

20 Ejemplo 4

La Endogлина unida a la membrana se requiere para la síntesis de COL1 inducida por TGFβ1

Aislamos y cultivamos hCF a partir de muestras de tejidos frescos obtenidas durante cirugía cardíaca. Se examinó primero el papel de la Endogлина empleando un planteamiento de pérdida de la función. En comparación con un anticuerpo control isotipo, el pre-tratamiento con el anticuerpo de anti-Endogлина atenuó la expresión de ARNm y proteica de colágeno de Tipo I inducido por TGFβ1 (Figura 7A). A continuación, se silenció la expresión de Endogлина empleando un planteamiento de ARNsi (siEng) en hCF. Comparado con el tratamiento con un ARNsi de control codificado, se redujo significativamente la expresión de ARNm y proteína del colágeno de Tipo I inducido por TGFβ1 (Figura 7B). Especialmente, el silenciamiento de la expresión de Endogлина también limitó significativamente la expresión de PAI-1 inducida por TGFβ1 y el factor de crecimiento conectivo (CTGF) en hCF (Figuras 8A-8B). Estos resultados destacan el importante papel que juega Endogлина en la regulación de la actividad de TGFβ1 en hCF. A continuación se investigó si la sobre-expresión de Endogлина promovería la síntesis de colágeno de Tipo I inducida por TGFβ1.

Ejemplo 5

La sobre-expresión de Endogлина imita la afección de deficiencia en Endogлина, debido probablemente al incremento de Endogлина soluble

Se transfectaron hCF con un adenovirus que sobre-expresa Endogлина de longitud completa (Ad-FL-Eng) o un adenovirus control que no expresa el transgen (AdNull). De manera interesante, la expresión de colágeno de Tipo I inducido por TGFβ1 se redujo significativamente en los hCF que sobre-expresan la Endogлина de longitud completa (Figura 7C). Para examinar por qué la sobre-expresión de Endogлина imita los resultados indicados en nuestros estudios de pérdida de la función, medimos los niveles de sEng en el medio condicionado a partir de hCF transfectados con Ad-FL-Eng y observamos niveles de sEng significativamente más altos en comparación con los controles tratados con AdNull (Figura 7D). Para investigar si la sEng puede regular la expresión de colágeno Tipo I inducido por TGFβ1, pretratamos los hCF con Eng soluble recombinante (RhsEng) y observamos un descenso de manera dependiente de la dosis en la proteína de colágeno tipo I (Figura 7E) y en la expresión de ARNm (Figura 8C) en comparación con los controles tratados con el vehículo. Para confirmar el papel de la sEng como un modulador negativo de la actividad de TGFβ1, transfectamos células COS-7 con un adenovirus que sobre-expresa sEng humana (Ad-hsEng) y confirmamos que se incrementa el nivel de sEng en un medio de cultivo de una manera dependiente a la dosis (Figura 8D). De una forma similar al tratamiento con RhsEng, los hCF tratados con TGFβ1 en presencia del medio condicionado a partir de células COS transfectadas con AdhsEng (AdhsEng-COS) se demostró también que desciende tanto la expresión de pSmad-2/3 inducida por TGFβ1 como la expresión de colágeno Tipo I (Figura 8F).

Ejemplo 6

La Endogлина soluble atenúa la fibrosis cardíaca en la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión

Para investigar si la sEng limita la fibrosis cardíaca in vivo, primero tratamos a ratones WT con inyecciones intravenosas de AdhsEng y observamos en la circulación niveles significativamente aumentados de sEng humana sin cambio en la expresión basal de los ratones sEng (Figura 9A). A continuación, tratamos los ratones WT con AdhsEng un día antes para la inducción de la sobrecarga de presión cardíaca. Cuatro semanas después de la TAC, los ratones tratados con AdhsEng mostraron menos fibrosis cardíaca (Figura 9B) y una menor expresión de

colágeno Tipo I del LV (Figura 9C) en comparación con los controles tratados con AdNull, indicando de esta manera la sEng como un regulador negativo de la fibrosis cardíaca en la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

Ejemplo 7

5 Implicación de la señalización de Endogлина en la sobrecarga de presión del ventrículo derecho

La función del ventrículo derecho (RV) es un determinante fundamental de los desenlaces clínicos en la hipertensión pulmonar (PH, de sus siglas en inglés). Por lo tanto, ensayamos la hipótesis de que la expresión de Eng inducida por PH aumenta la actividad de TGFβ1 y la fibrosis en el RV, y que bloqueando la actividad de Endogлина se limita la fibrosis del RV en PH.

- 10 Para estudiar el papel funcional de la Endogлина en el remodelado del RV, se realizó la constricción de la arteria pulmonar (PAC, de sus siglas en inglés), en ratones WT y heterocigótico de Endogлина (Eng^{+/-}). En comparación con los controles de simulación, la PAC aumentó la presión sistólica del RV de igual forma tanto en ratones WT (21±6 frente a 50±4, p<0,01) como en ratones Eng^{+/-} (24±3 frente a 46±9, p<0,01). En ratones WT, la expresión proteica y de ARNm de Eng aumentó en el RV después de 7 días de PAC y se acompañó de fibrosis e hipertrofia del RV. Al
- 15 contrario que en ratones WT, los ratones Eng^{+/-} preservaron el volumen sistólico (4±1 frente a 7±1, p<0,01) y el gasto cardíaco (1,9±0,7 frente a 3,6±0,8 ml/min, p<0,01). Se observó menos fibrosis en el RV en ratones Eng^{+/-}, mientras que la masa del RV era comparable al de los ratones WT después de la PAC. A pesar de que los niveles de TGFβ1 activo aumentaron de manera similar en ratones WT y ratones Eng^{+/-}, los niveles de pSmad-2/3 y pERK-1/2 incrementaron en el RV de ratones WT, pero no cambiaron en los ratones Eng^{+/-} después de la PAC. La
- 20 dependencia de la señalización de TGFβ1 sobre la expresión de Endogлина se ensayó además empleando un anticuerpo de anti-endogлина neutralizante (TRC105; Tracon Pharma). En comparación con los controles tratados con IgG, el TRC105 limitó la fibrosis del RV, la expresión de pSmad-2/3, y la expresión de colágeno Tipo 1 en ratones WT después de la PAC. En comparación con los ratones WT, tanto los ratones Eng^{+/-} como los ratones tratados con TRC105 mejoraron la supervivencia después de la PAC (60%; n=7/12 frente a 100%; n=8/8 frente a
- 25 88%; n=7/8, respectivamente, p<0,01 para ratones Eng^{+/-} o ratones TRC105 frente a ratones WT).

Ejemplo 8

Materiales y métodos

En los ejemplos descritos anteriormente se emplearon los siguientes materiales y métodos.

Modelo TAC de ratón

- 30 Ratones C57/B16 adultos, machos, de 14-16 semanas de edad de tipo salvaje y de tipo Eng^{+/-} se sometieron a constricción de la aorta torácica (TAC) como se describe anteriormente (Donaldson et al., *Circ. Res.* 104:265-75, 2009). Los ratones se sacrificaron a las dos, cuatro y diez semanas después de la TAC, y se obtuvieron el tejido cardíaco y la sangre para análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR), Western blot, histología, y análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs). Se proporcionaron ratones Eng^{+/-} por
- 35 Michelle Letarte, Ph.D. de la Universidad de Toronto.

Caracterización fisiológica in vivo

- El ecocardiograma transtorácico se realizó en ratones anestesiados con una inyección intraperitoneal de 10 µl/g de Avidina empleando una máquina electrográfica Sonos 5500 (Hewlett-Packard) equipada con un transductor de 15
- 40 mHz (Acuson). Se obtuvieron imágenes del eje corto parasternal a través del ventrículo izquierdo a nivel del músculo papilar. Se grabaron los trazados en modo M para el área transversal del LA, el grosor de la pared posterior del LV y las dimensiones diastólica y sistólica final del LV. Las dimensiones se promediaron a través de tres ciclos cardíacos. Se realizó el ensayo hemodinámico para cada punto de tiempo de cultivo como se describió anteriormente por nuestro laboratorio empleando un catéter de conductancia para la medición de los ciclos de volumen-presión (Donaldson et al., *Circ. Res.* 104:265-75, 2009).

45 Estudios in vitro

- Se aislaron los hCF a partir del tejido cardíaco recogido durante cirugía cardíaca en el Centro Médico Tufts, como se describe anteriormente (Neuss et al., *Cell Tissue Res.* 286:145-53, 1996). Las células se cultivaron en un medio de cultivo de fibroblastos que contiene albúmina de suero bovino al 2% (FGM-2, Lonza). Se confirmó el fenotipo del fibroblasto empleando inmunotinción para el péptido específico del fibroblasto y del receptor con dominio de
- 50 discoidina 2 (DDR2). Todos los experimentos in vitro emplearon un transcurso de células inferior a 4 veces. Los hCF se cultivaron hasta una confluencia del 80%, después el suero se alimentó durante 24 horas. El TGFβ1 (Sigma-Aldrich Cat. N° T7039) se preparó como una disolución madre de 50 µg/ml en HCl 3 µM. Las células se trataron con TGFβ1 10 ng/ml durante 30 minutos para evaluar los cambios en la expresión de pSmad 2/3 o durante 16-24 horas para estudiar la síntesis de colágeno inducida por TGFβ1. Se recogieron el ARN, los lisados de proteína, y el medio condicionado para el posterior análisis de la expresión de colágeno y de Endogлина.
- 55

Reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR)

Para todos los experimentos RT-PCR basados en las células, se extrajo directamente el ARN empleando Trizol (Invitrogen). Para el RT-PCR basado en el tejido, el ARN total se extrajo a partir de muestras de tejido homogeneizado empleando el reactivo Trizol. El ARN total se cuantificó empleando un espectrofotómetro y se reservaron 5 µg del ARN extraído, se transcribió de manera inversa en el ADNc empleando un Kit de Transcripción Inversa de Elevada Capacidad (Applied Biosystems) con hexámeros aleatorios para RT-PCR con enzimas RT según el protocolo del kit. Una décima parte de la reacción RT se empleó como un modelo PCR utilizando una enzima PFX Platinum (Invitrogen), magnesio 0,5 mM, y los cebadores para Endoglina humana y de ratón, colágeno Tipo I, TGFβ1, PAI-1, y CTGF. Para todos los experimentos RT-PCR, las muestras se cuantificaron por triplicado empleando 40 ciclos realizados a 94°C durante 30 segundos, a 60°C durante 45 segundos, a 72°C durante 45 segundos empleando un Sistema de Detección de Secuencias 7900 ABI Prism®.

Análisis inmunoblot (Western blot)

Los homogeneizados tisulares o las células cultivadas lavadas con un tampón fosfato salino (PBS) se lisaron en hielo en tampón RIPA (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%; deoxicolato 0,5%; SDS 0,1%) que contienen inhibidores de la proteasa y la fosfatasa (PMSF 1 mM; EDTA 1 mM; leupeptina 1 µg/ml, aprotinina, y pepstatina A; ortovanadato de sodio 1 mM; fluoruro de sodio 50 mM; β-glicerofosfato 40 mM) y se centrifugaron después a 18.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se cuantificó la proteína total empleando una curva estándar (Bio-Rad). Se sometieron a electroforesis veinticinco µg de proteínas a través de geles SDS-PAGE del 4 al 12% y después se transfirieron a membranas de Immobilon-P (PVDF) (Millipore, Bedford, Mass.). Después de bloquear durante la noche, los blots se incubaron con diluciones 1:1.000 del anticuerpo primario apropiado (véase a continuación), seguido de la incubación con una dilución 1:5.000 del anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (Amersham). Las bandas inmunoreactivas se detectaron mediante auto-radiografía empleando quimioluminiscencia mejorada (ECL-Plus; Amersham) y se cuantificaron mediante análisis densitométrico empleando un programa informático UN-SCAN-IT (Silk Scientific). Los blots se pueden desmontar con tampón de deshibridación (stripping) (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,7) a 60°C durante 20 minutos y después se re-sondaron para estandarizar las cantidades de la proteína inmunoprecipitada. Las bandas resultantes se analizaron densitométricamente y se tomaron imágenes con el programa informático. Los anticuerpos para las proteínas diana de ser humano y de ratón incluían Endoglina, COL1, pSmad2/3, pSmad1/5/8, Smad3 total, Smad1 total, CD-31, y calcineurina.

30 Protocolo ARNsi in vitro

Se cultivaron fibroblastos cardíacos hasta una confluencia del 80% en FGM-2 sin enriquecimiento antibiótico. Para todos los constructos de ARNsi, la disolución madre de ARNsi 50 µM (Ambion) se diluyó hasta una concentración de trabajo de 1,0 nM en Optimem (Invitrogen). Esta disolución de trabajo se combinó con 2 µl de reactivo de transfección de lípidos catiónicos Lipofectamine (Invitrogen) diluido en 98 µl de Optimem. Después de 20 minutos de incubación, las células cultivadas se expusieron a una combinación de ARNsi/Lipofectamine. Las células se trataron después con ARNsi de Endoglina humana (Ambion Cat. N° 145527). Todos los experimentos de ARNsi se controlaron con ARNsi codificado (control negativo; Ambion Cat. N° 4390844) y con ARNsi GAPDH (control positivo; Ambion Cat. N° 4390850). 24-36 horas después de la transfección, el ARN total se aisló y se convirtió en ADNc para el análisis RT-PCR como se describe anteriormente. En una serie separada, los lisados de proteína se cultivaron a las 36-48 horas después de la transfección y se analizaron empleando análisis de Western blot como se describe anteriormente.

Protocolo de tratamiento de Endoglina soluble in vitro

Los fibroblastos cardíacos de suero se cultivaron hasta una confluencia del 80%, y después se trataron con Endoglina soluble humana recombinante (R&D Systems) derivada a partir de una secuencia de longitud completa del dominio extracelular de Endoglina durante 24 horas. Las células se estimularon entonces con TGFβ1 10 ng/ml (Sigma) durante 24-48 horas adicionales antes del aislamiento del ARN total y de los lisados de proteína para el análisis RT-PCR y de Western blot.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Se emplearon kits ELISA disponibles comercialmente (Endoglina humana (R&D Systems, Cat. N° DNDG00); Endoglina de ratón (R&D Systems, Cat. N° DY1320)) para analizar el medio condicionado y las muestras de suero a partir de los experimentos en ratones.

Infección adenoviral de hCF in vitro

Para los estudios de sobre-expresión, se nos proporcionó gentilmente Endoglina humana de ADNc de longitud completa que expresa la primera generación de adenovirus (Ad-FL-Eng) por el Centro Médico de Maine del Dr. Calvin. Para la sobre-expresión de Endoglina soluble, se nos proporcionó gentilmente Endoglina humana de dominio extracelular para ADNc de longitud completa que expresa adenovirus (AD-hs-Eng) por el Dr. Ananth Karumanchi

(Centro Médico Beth Israel Deacones). Las transfecciones adenovirales in vivo se controlaron empleando un adenovirus que no expresa el transgen (AdNull).

Multiplicidad óptima de infección (MOI)

- 5 Los fibroblastos cardíacos se cultivaron primero hasta una confluencia del 80% en placas de 12 pocillos en 2 ml de FGM-2. Los virus se descongelaron y se añadieron empleando una curva de dosis MOI típica (0, 50, 100, 200, 500, 1000 MOI). Las células infectadas con los virus se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se extrajeron el ARN total y los lisados de proteína para el análisis de Endoglina humana por RT-PCR y de Western blot.

Protocolo de sobre-expresión in vitro

- 10 El confluente de hCF cultivado en placas de 100 mm (pasillo 3) se infectó con un adenovirus que no expresa el transgen (AdNull) en 20 unidades formadoras de placas (p.f.u./célula) en 3 ml de FGM-2 (Lonza). Después de 1 hora de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron en 10 ml de FGM-2. El medio de cultivo se cambió en intervalos de 24 horas, y el medio más las células se cultivaron a 1, 4, 5, 10, 14, 21, y 28 días después de la transfección para análisis de Western blot, ELISA, y RT-PCR. Como controles de este experimento se empleó un grupo de fibroblastos cardíacos que no se infectó.

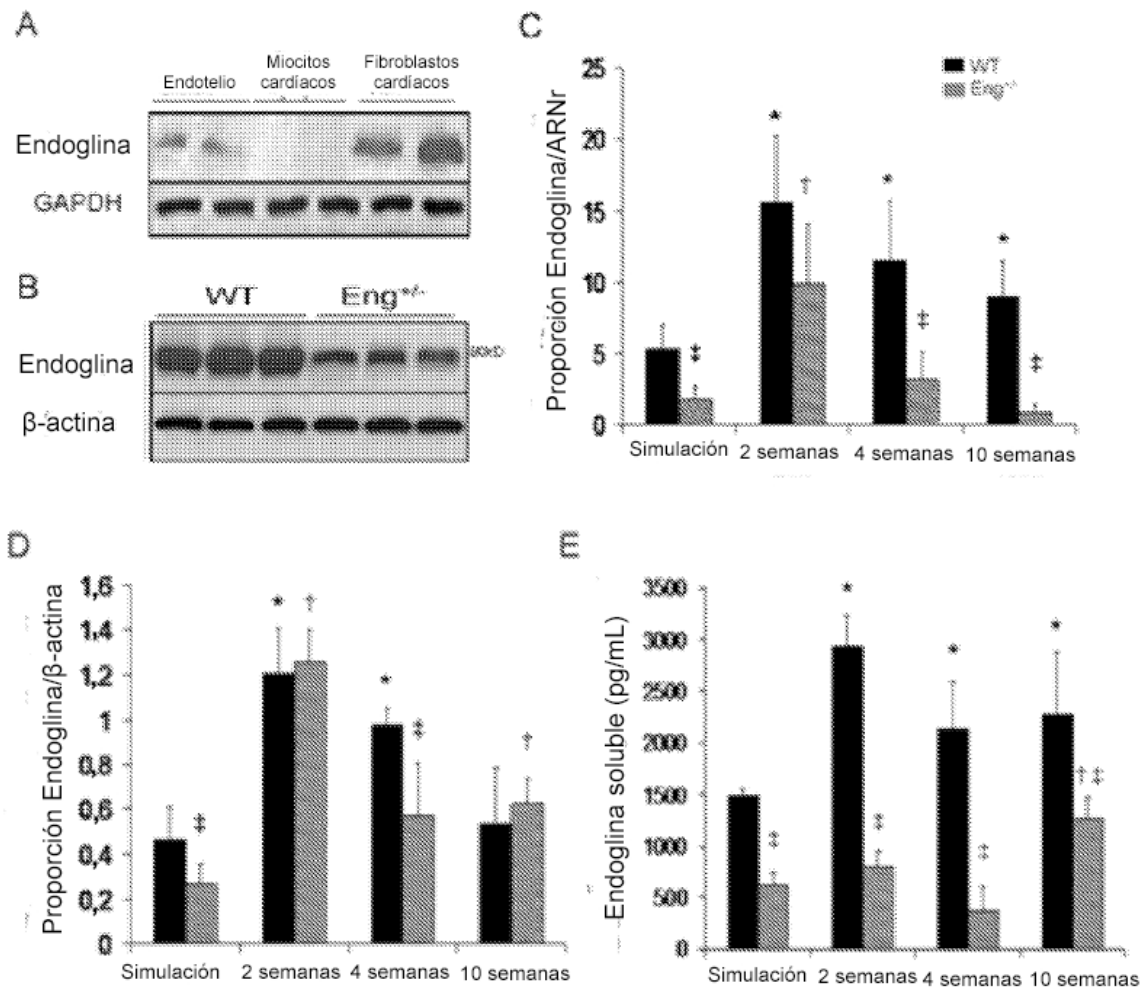
- 15 Experimento de un medio condicionado con Endoglina Soluble

Para estudios de medios condicionados, se transfectaron células COS-7 con concentraciones crecientes de Ad-hs-Eng o AdNull durante 24 horas. El medio acondicionado se aisló y los niveles de sEng humana se confirmaron mediante ELISA. El medio acondicionado se transfirió después a placas de 12 pocillos que contienen suero de hCF, el cual se estimuló después con TGFβ1 (10 ng/ml).

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o es un antagonista del receptor de Endogлина para usar en un método para tratar o tratar profilácticamente la insuficiencia cardíaca, la disfunción del ventrículo izquierdo, la disfunción del ventrículo derecho, la fibrosis ventricular derecha debido a hipertensión pulmonar, cardiomiopatía, o post infarto de miocardio en un sujeto que necesita del mismo, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o que es un antagonista del receptor de Endogлина, en donde dicho sujeto padece o ha padecido de una enfermedad arterial coronaria.
2. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según la reivindicación 1, en donde dicha administración da como resultado una reducción de la fibrosis cardíaca.
3. Una composición que comprende un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o que es un antagonista del receptor de Endogлина, para usar en un método para reducir la fibrosis en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de Endogлина, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que inhibe la actividad de Endogлина o que es un antagonista del receptor de Endogлина.
4. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según la reivindicación 3, en donde dicha fibrosis es fibrosis cardíaca.
5. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según la reivindicación 3 ó 4, en donde dicho sujeto padece de una afección seleccionada del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, disfunción del ventrículo izquierdo, disfunción del ventrículo derecho, hipertensión, cardiomiopatía, y post infarto de miocardio.
6. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, y 5, en donde dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca congestiva, o insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, o en donde dicha disfunción del ventrículo izquierdo o derecho es una disfunción del ventrículo izquierdo o derecho asintomático, o una disfunción del ventrículo izquierdo o derecho después de un infarto de miocardio, o en donde dicha cardiomiopatía es la fase final de una cardiomiopatía dilatada.
7. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 3 a la 6, en donde dicho paciente padece o ha padecido de una enfermedad arterial coronaria.
8. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, en donde dicho sujeto padece o ha padecido de una enfermedad cardíaca congénita, un ataque cardíaco, una enfermedad de la válvula cardíaca, o una arritmia.
9. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, en donde dicho anticuerpo se une al receptor de Endogлина.
10. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, en donde dicho anticuerpo se une a la Endogлина unida a la membrana.
11. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo neutralizante.
12. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método de la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo es TRC105.
13. La composición que inhibe la actividad de Endogлина para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12, en donde dicha administración es intravenosa, oral, intramuscular, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, o intralesional.



Figuras 1A-1E

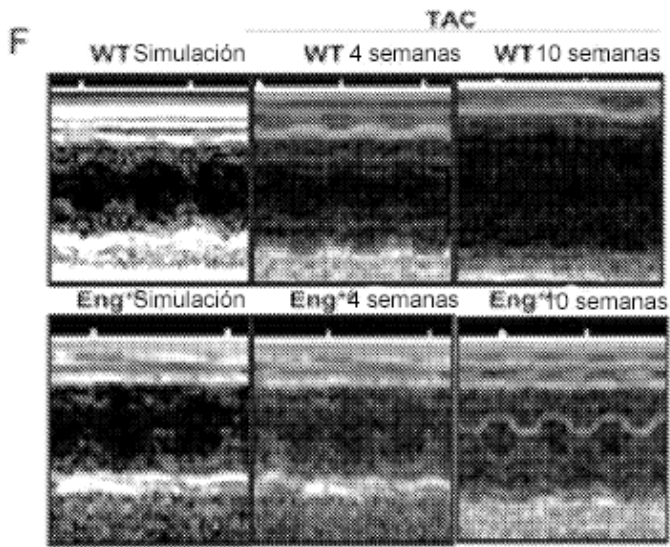


Figura 1F

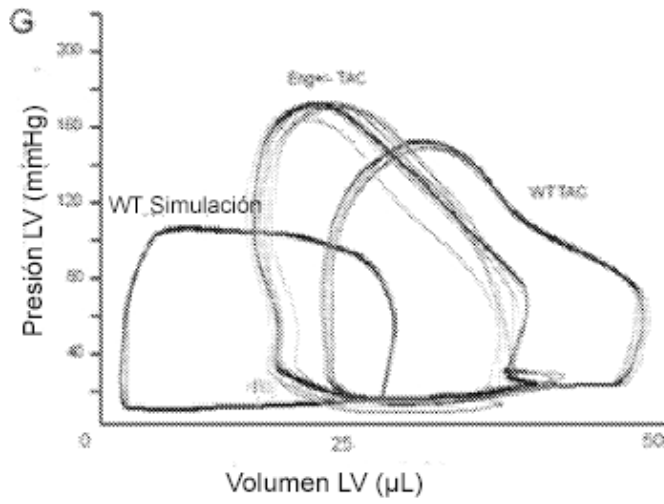


Figura 1G

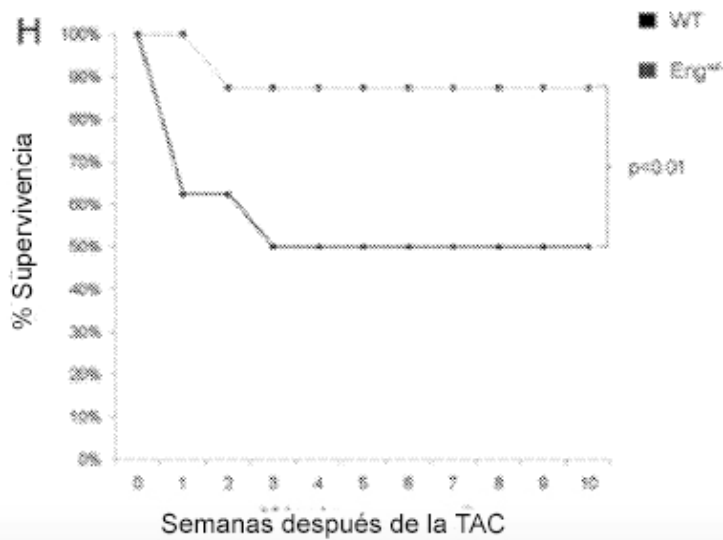


Figura 1H

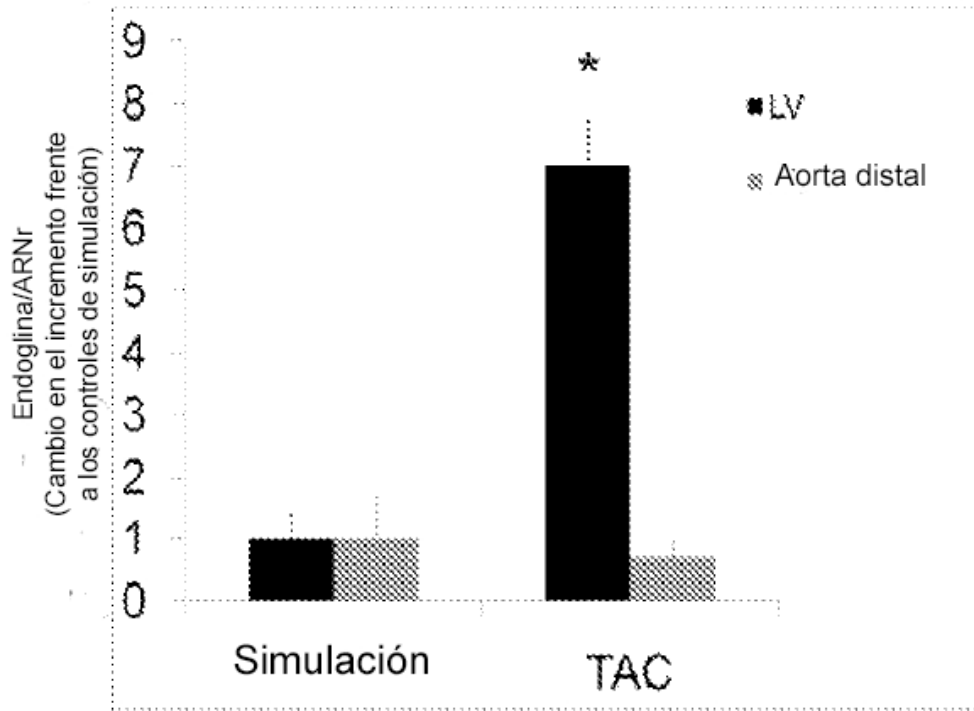
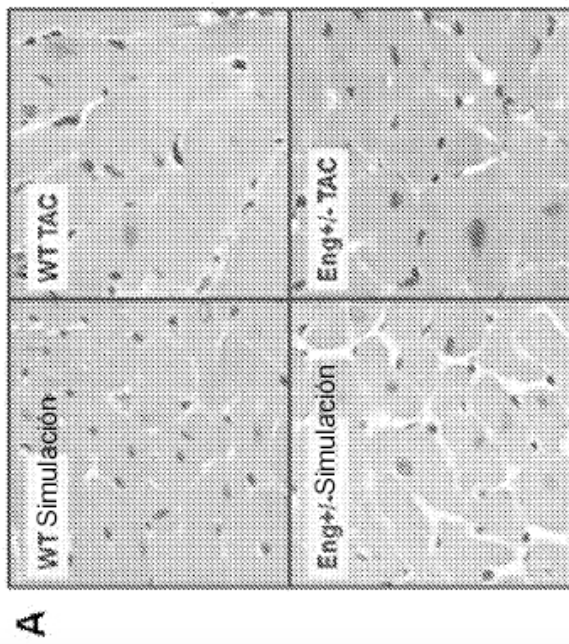
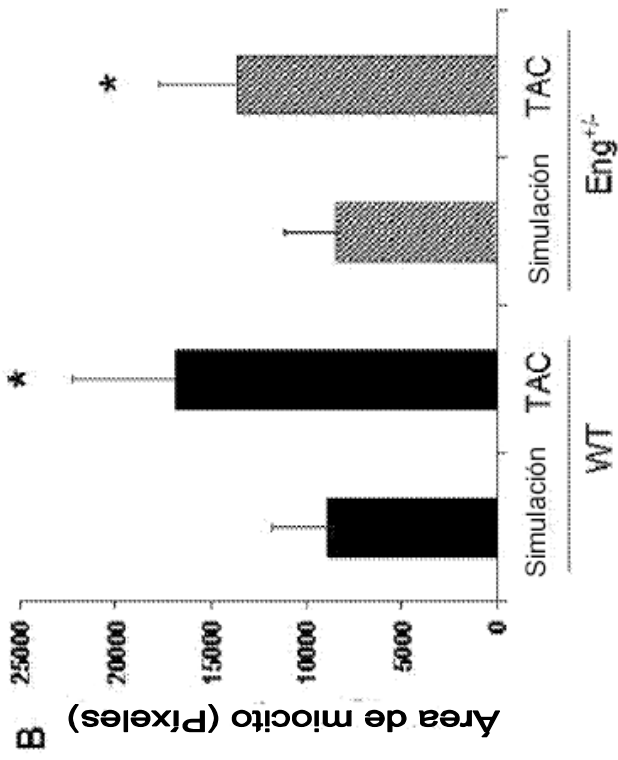
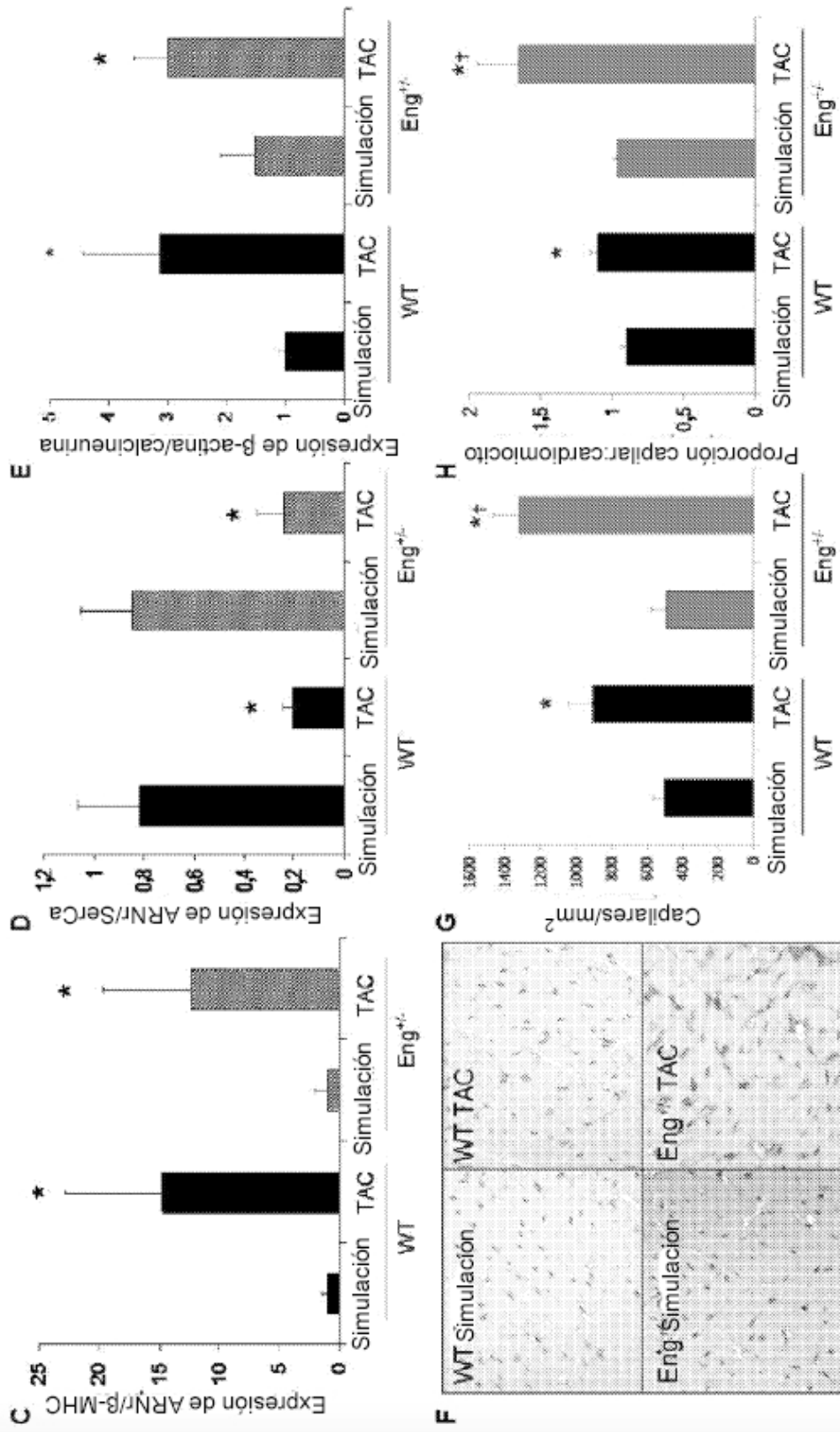


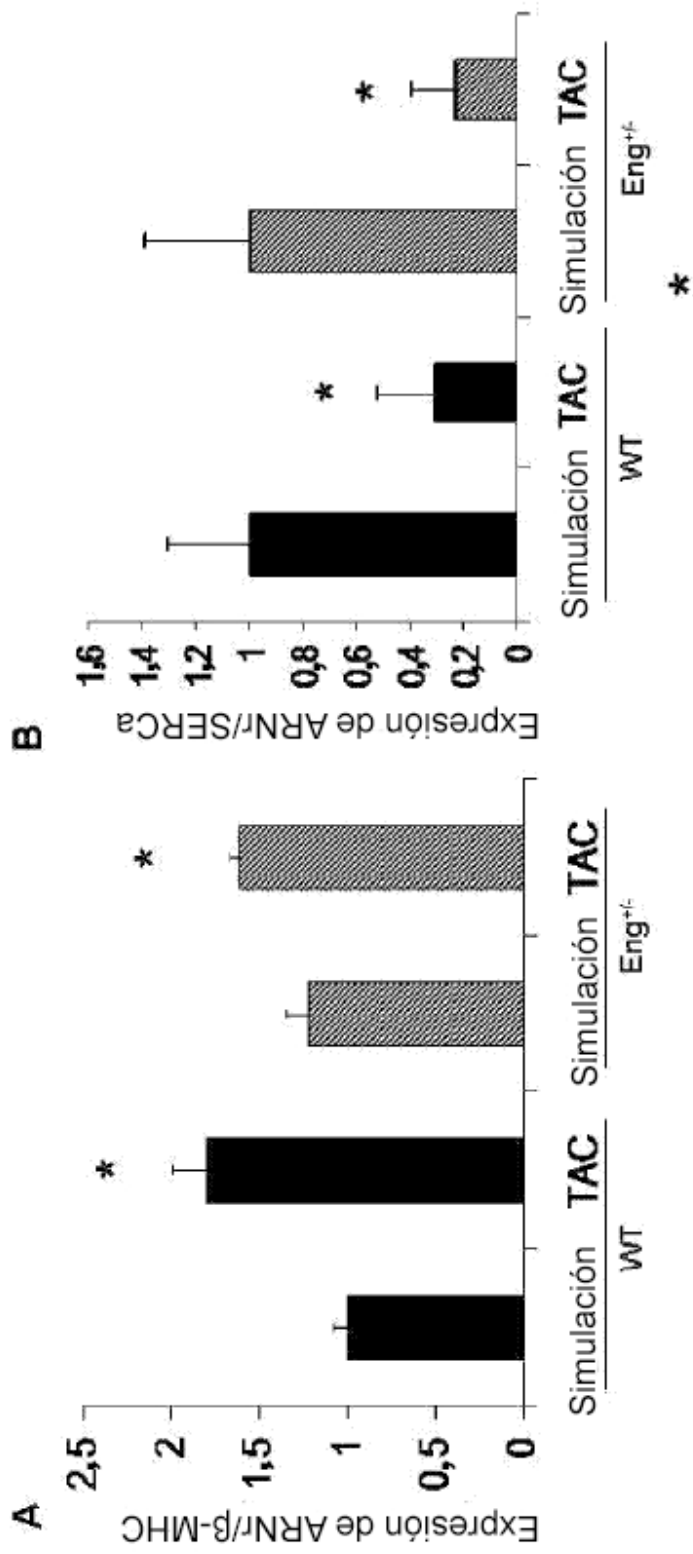
Figura 2



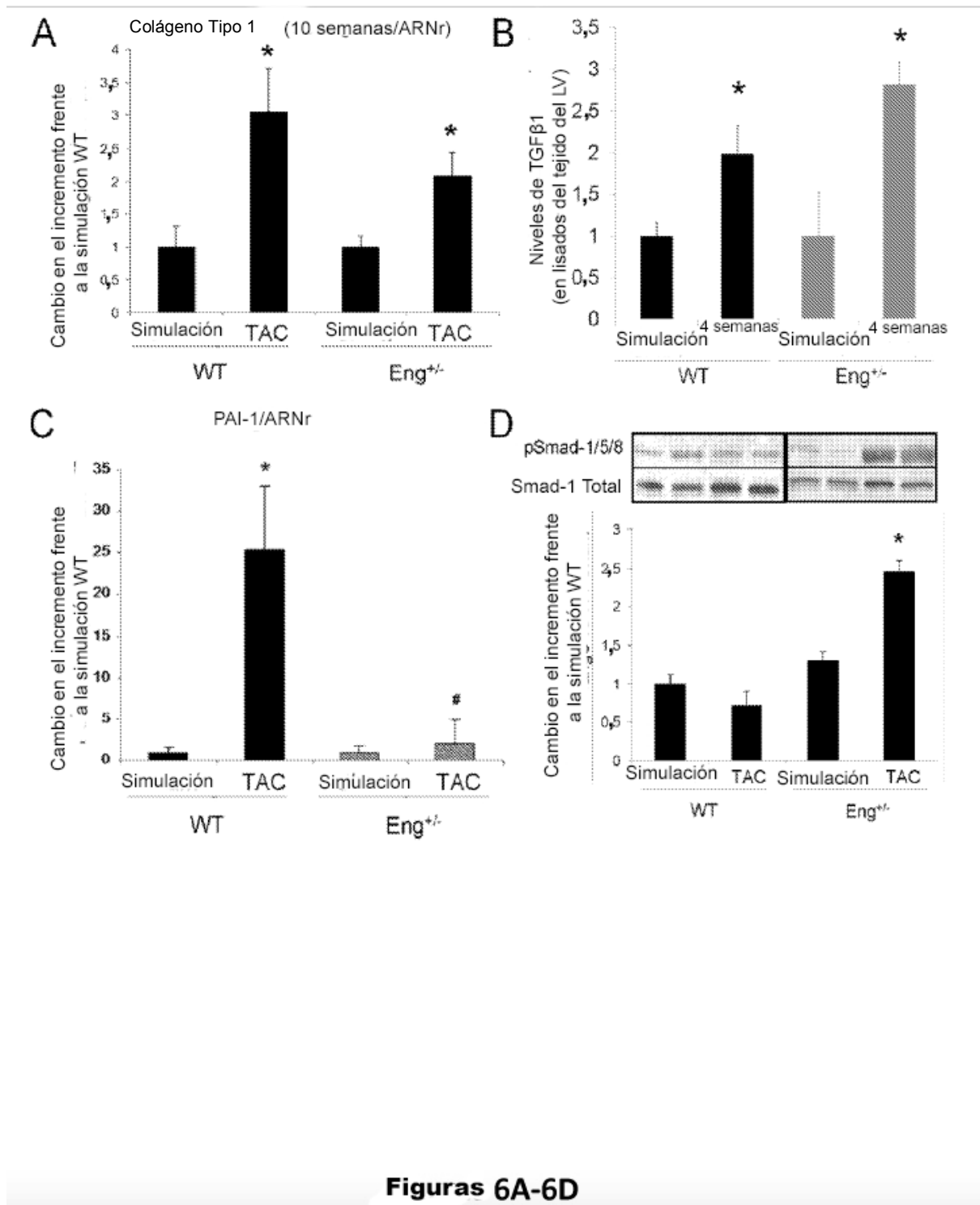
Figuras 3A-3B

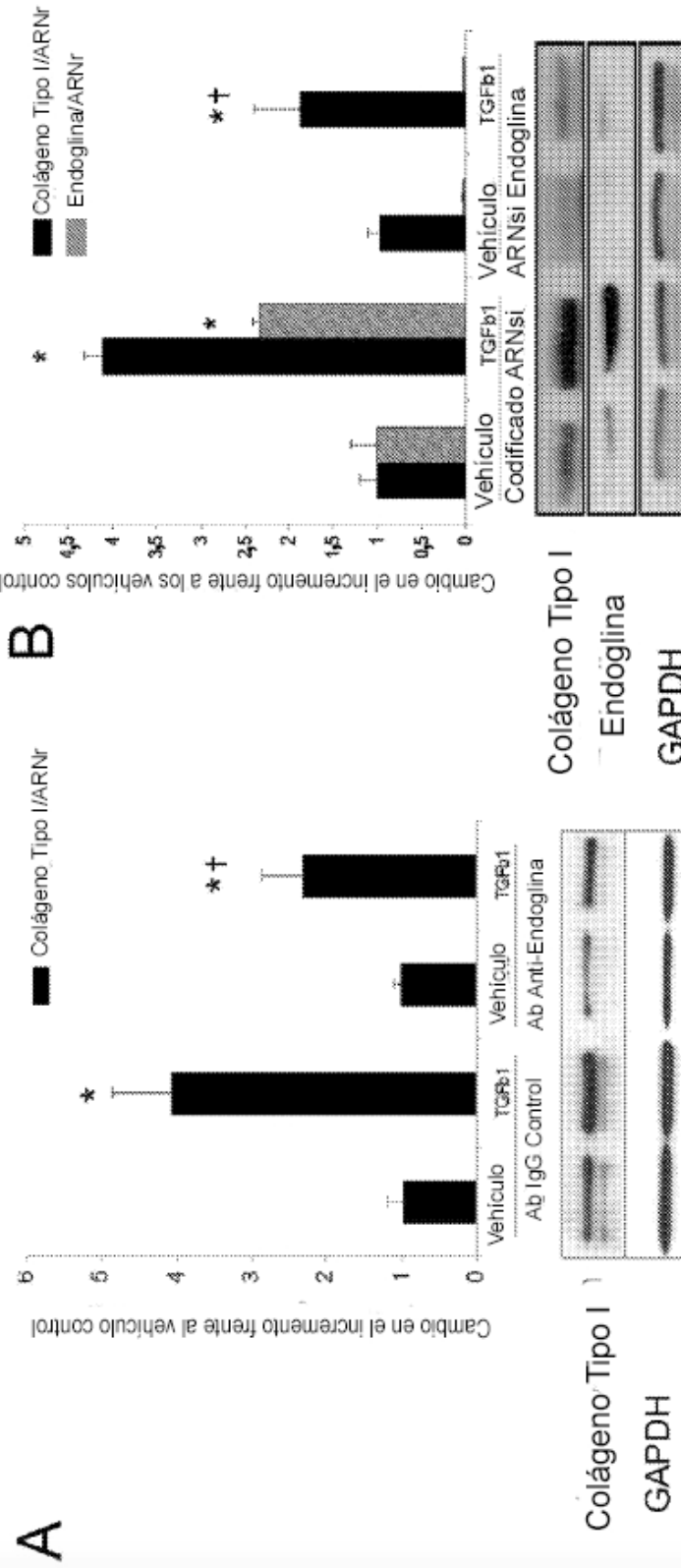


Figuras3C-3H

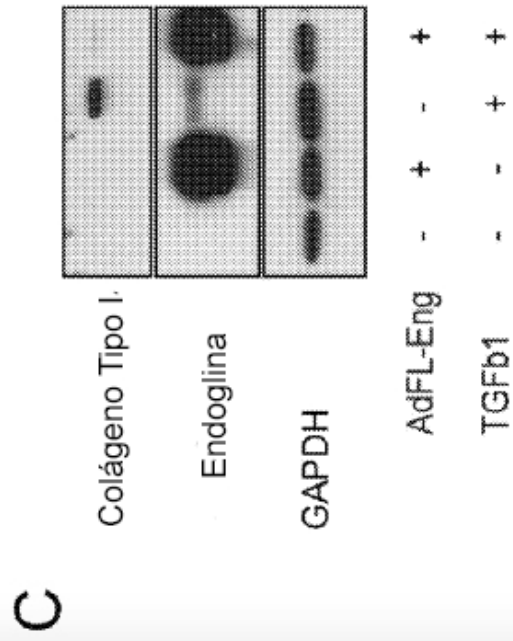
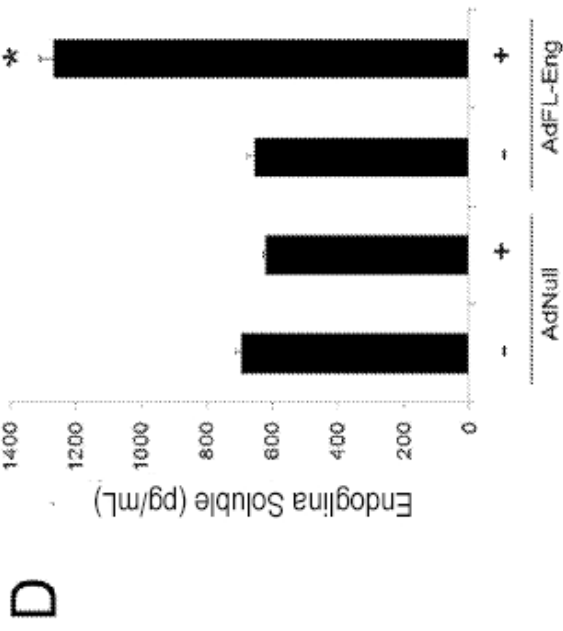


Figuras 4A-4B

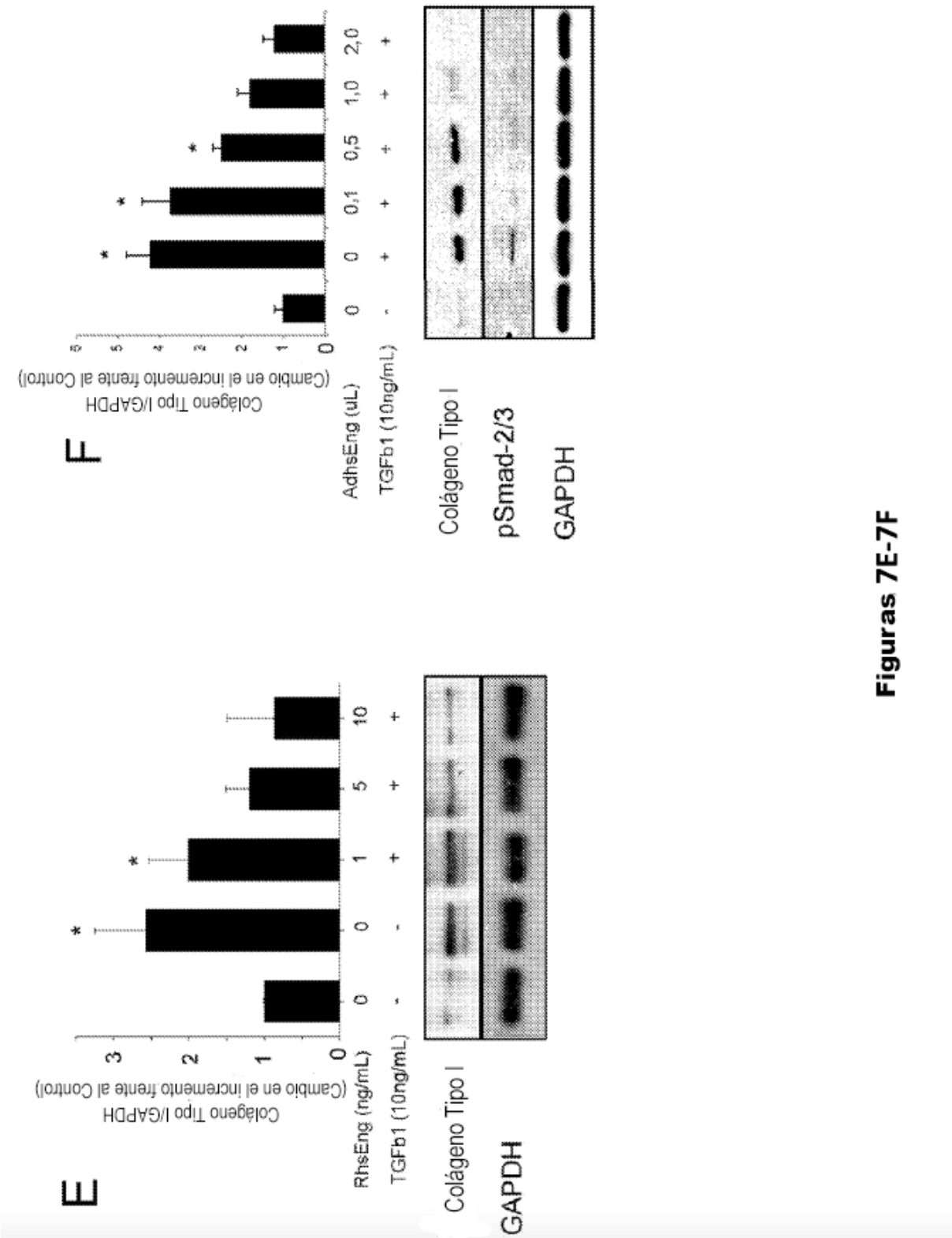




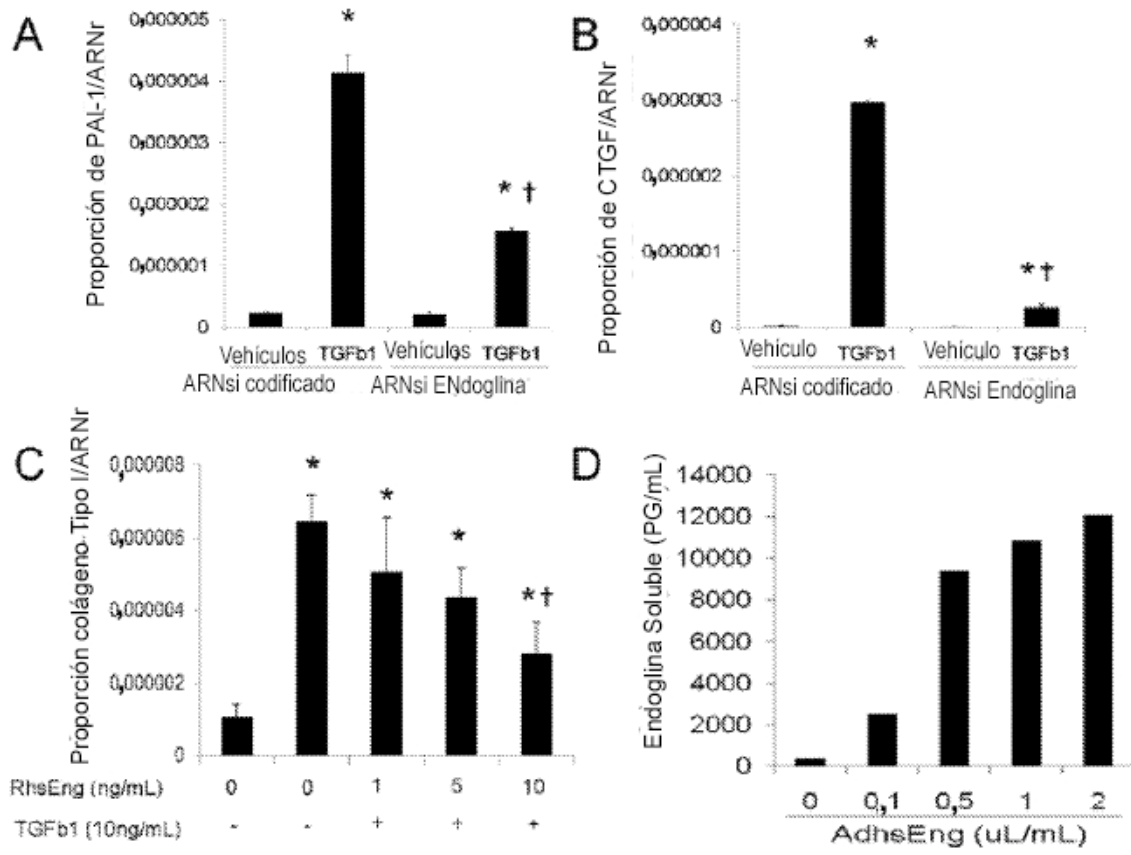
Figuras 7A-7B



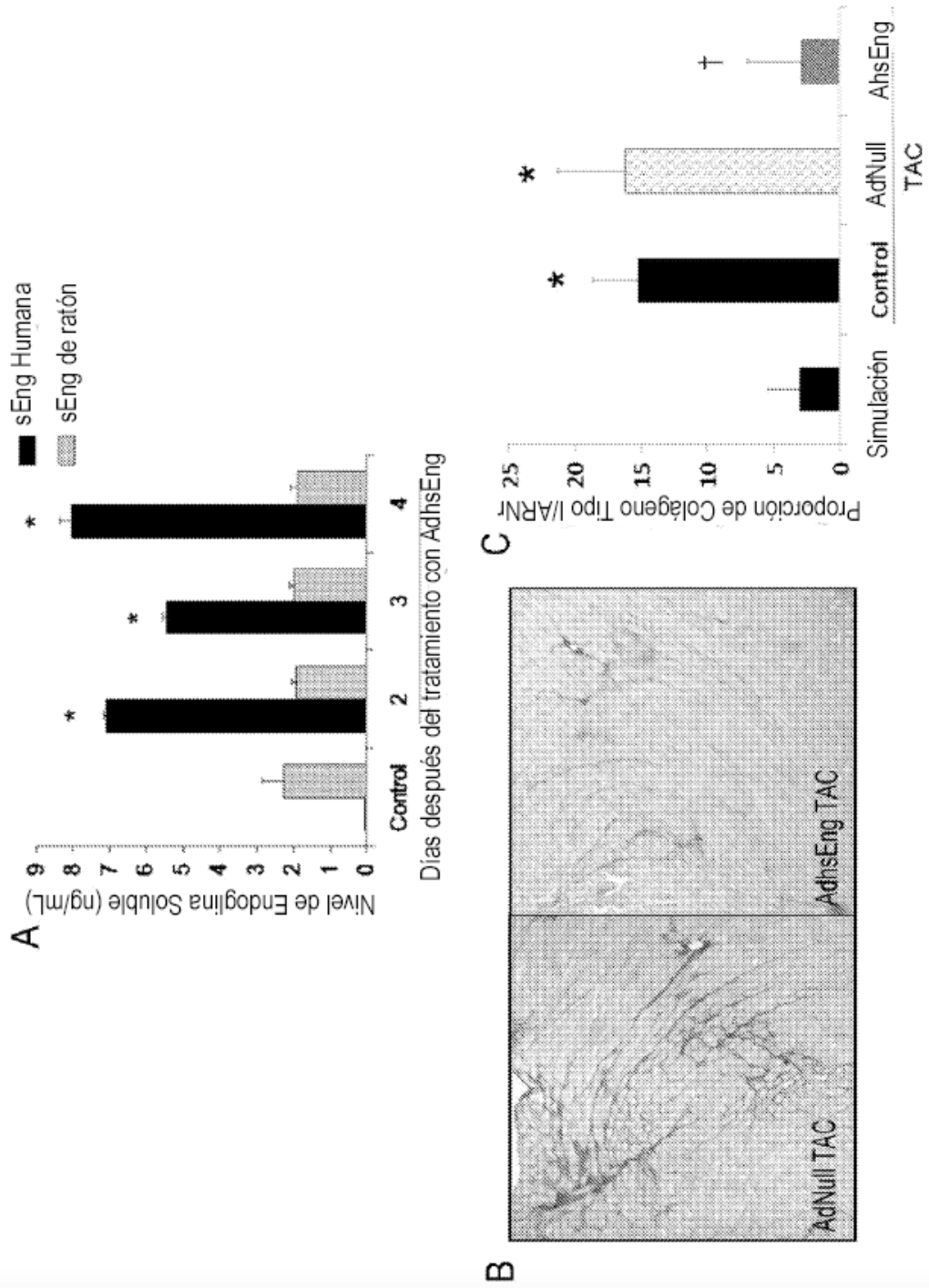
Figuras 7C-7D



Figuras 7E-7F



Figuras 8A-8D



Figuras 9A-9C

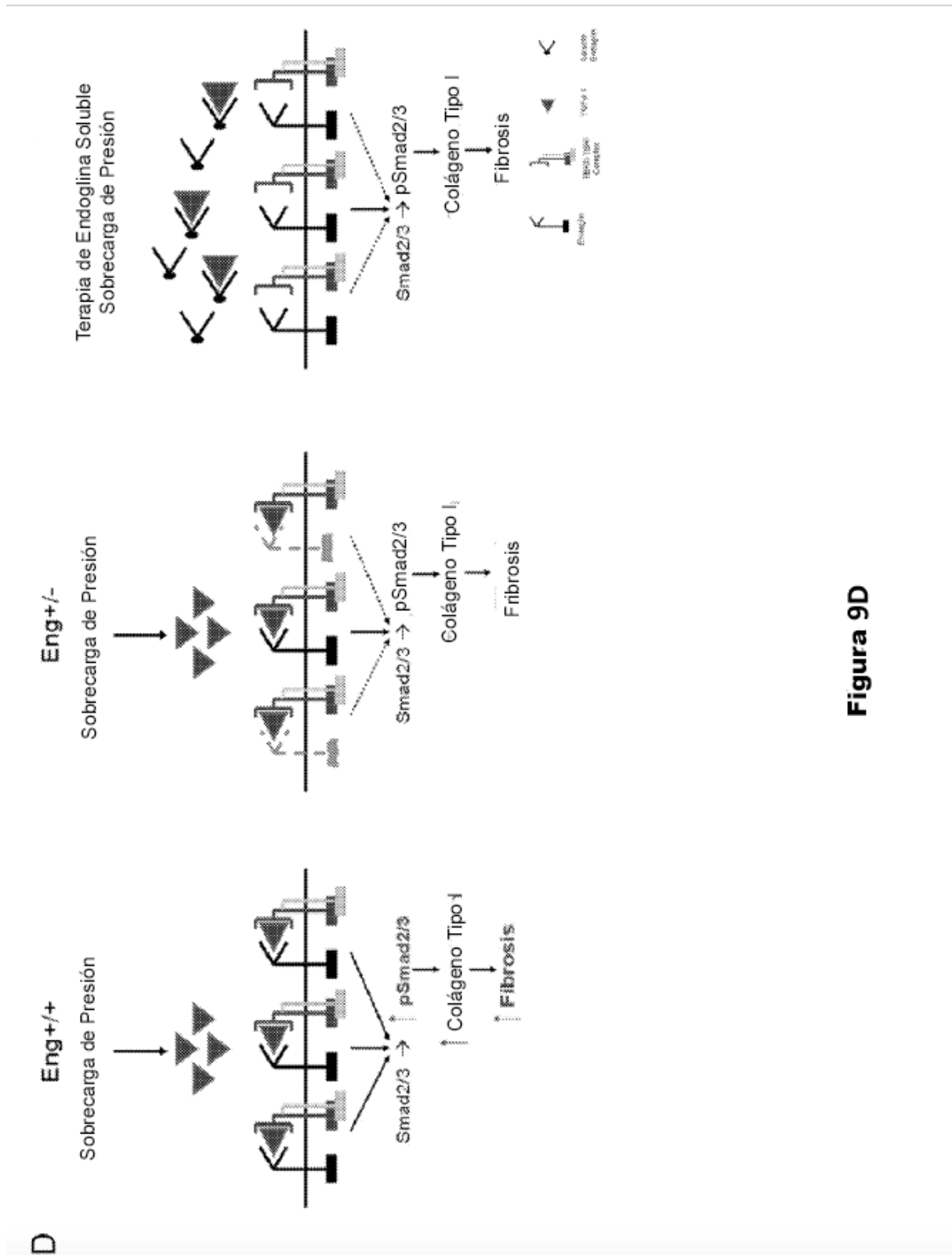


Figura 9D

Precursor de la isoforma 1 de Endoglina

```

1 mdrgtlplav allascsls ptslaetvhc dlqpvqperg evtyttsqvs kgcvaqapna
61 ilevhvlfle fptgpsqlle tlqaskqngt wprevllvls vnssvflhlq algiplhlay
121 nsslvtfqep pgvnttelps fpktqilewa aergpitsaa elndpqsill rlgqaqgsls
181 fcmleasqdm grtlewrprt palvrgchle gvaghkeahi lrvlpghsag prtvtvkvel
241 scapgdldav lilqgppyvs wlidanhnmq iwttegeysfk ifpeknirgf klpdtpqgll
301 gearmlnasi vasfvelpla sivslhassc ggrlqtspap iqtppkdtc spellmsliq
361 tkcaddamt1 vlkkelvahl kctitgltfw dpsceaedrg dkfvlsays scgmqvsasm
421 isneavvnil sssspqrkkv hclnmdslsf qlglylsphf lqasntiepg qqsfvqvrvs
481 psvsefllql dschldlgpe ggtveliqgr aakgncvsll spspegdprf sflhfytvp
541 ipktgtlscv valrpktgsq dqevhrtvfm rlniispdls gctskglvlp avlgitfgaf
601 ligalltaal wyiyshtresp skrepvvava apassesst nhsigstqst pcstssma

```

Precursor de la isoforma 2 de Endoglina

```

1 mdrgtlplav allascsls ptslaetvhc dlqpvqperg evtyttsqvs kgcvaqapna
61 ilevhvlfle fptgpsqlle tlqaskqngt wprevllvls vnssvflhlq algiplhlay
121 nsslvtfqep pgvnttelps fpktqilewa aergpitsaa elndpqsill rlgqaqgsls
181 fcmleasqdm grtlewrprt palvrgchle gvaghkeahi lrvlpghsag prtvtvkvel
241 scapgdldav lilqgppyvs wlidanhnmq iwttegeysfk ifpeknirgf klpdtpqgll
301 gearmlnasi vasfvelpla sivslhassc ggrlqtspap iqtppkdtc spellmsliq
361 tkcaddamt1 vlkkelvahl kctitgltfw dpsceaedrg dkfvlsays scgmqvsasm
421 isneavvnil sssspqrkkv hclnmdslsf qlglylsphf lqasntiepg qqsfvqvrvs
481 psvsefllql dschldlgpe ggtveliqgr aakgncvsll spspegdprf sflhfytvp
541 ipktgtlscv valrpktgsq dqevhrtvfm rlniispdls gctskglvlp avlgitfgaf
601 ligalltaal wyiyshtrey prppq

```

Figura 10